

THESIS

MUNICH

1967

BEITRÄGE ZUM MECHANISMUS DER WIRKUNG
DES α -HEPARINS UND VON HEPARINOIDEN
IM BLUTGERINNUNGSSYSTEM

Wolfram / Klinger

LANE MEDICAL LIBRARY
STANFORD UNIVERSITY
300 PASTEUR DRIVE
PALO ALTO, CALIF. 94304

AUS DER I. MEDIZINISCHEN KLINIK DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Direktor: Prof. Dr. H. Schwiegk

BEITRÄGE ZUM MECHANISMUS DER WIRKUNG
DES α -HEPARINS UND VON HEPARINOIDEN
IM BLUTGERINNUNGSSYSTEM

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Wolfram Klinger
aus Reichenberg

München 1967

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Referent:	Prof. Dr. R. MARX
Coreferent:	Prof. Dr. H. SCHWIEGK
Dekan:	Prof. Dr. M. KIESE

Tag der mündlichen Prüfung: 9. 5. 1967

"La vie consiste en sang. Sang est le siège de l'ame.
Pourtant un seul labeur poine ce monde, c'est forger
sang continuellement."

(RABELAIS: Gargantua und Pantagruel, 3. Buch,
IV. Kapitel)



Digitized by the Internet Archive
in 2026

I N H A L T

ERSTER HAUPTTEIL:

BEITRÄGE ZUM MECHANISMUS DER WIRKUNG DES α -HEPARINS IM BLUTGERINNUNGSSYSTEM

7

A. ALLGEMEINER TEIL

Heparin (α - und β -Heparin)

7

I. Geschichte, Chemie

7

II. Darstellung, Nachweis, Vorkommen

10

III. Wirkungen

14

1. auf die einzelnen Phasen der Blutgerinnung

14

2. auf die Fibrinolyse

15

3. auf die Plasmalipide

16

4. auf verschiedene Enzyme

17

5. auf das Bindegewebe und die Blutgefäße

17

IV. Verhalten exogenen α -Heparins im Körper

18

1. Resorption

18

2. Elimination

18

B. SPEZIELLER TEIL

19

Heparincofaktor und Antithrombin III

19

I. Diskussion von Eigenschaften und gegenseitiger Beziehung der beiden Stoffe anhand der Literatur

19

II. Experimenteller Teil

21

1. Versuch einer Lokalisation der beiden Stoffe in den Plasmaproteinen und ihrer Differen- zierung

21

a. Methodik

21

b. Durchführung der Experimente

27

2. Wirkung des Antihistaminicums ANTISTIN^R auf α -Heparin, verschiedene Heparinoide, Antithrombin III und Thrombin

30

III. Zusammenfassendes Ergebnis der experimen- tellen Untersuchungen des ersten Hauptteiles

33

ZWEITER HAUPTTEIL:

BEITRÄGE ZUM MECHANISMUS DER WIRKUNG VON
HEPARINOIDEN IM BLUTGERINNUNGSSYSTEM 34

A. ALLGEMEINER TEIL

Heparinoide 34

I. Definition des Begriffes 34

II. Geschichte 35

III. Wirkungen 35

1. Heparinähnliche Wirkungen

2. Unterschiede zur Heparinwirkung

B. SPEZIELLER TEIL 39

I. Eine Theorie von R. PULVER über den Wirkungs-
mechanismus der Heparinoide 39II. Diskussion der Theorie R. PULVERs und Unter-
suchungen über die Heparincofaktorabhängigkeit
und Heparincofaktoraffinität verschiedener
Heparinoide 42III. Zusammenfassendes Ergebnis der experimen-
tellen Untersuchungen des zweiten Hauptteiles 57

LITERATURVERZEICHNIS 59

ERSTER HAUPTTEIL

BEITRÄGE ZUM MECHANISMUS DER WIRKUNG DES α -HEPARINS IM BLUTGERINNUNGSSYSTEM

A. ALLGEMEINER TEIL

Heparin (α - und β -Heparin)

I. Geschichte, Chemie

"The heparphosphatid on the other hand, when purified by many precipitations in alcohol at 60°, has no thromboplastic action and in fact shows a marked power to inhibit the coagulation" — dieser Satz aus einer Arbeit des Medizinstudenten Mc LEAN (1) galt lange Zeit als die erste Erwähnung des (α -)Heparins in der Literatur (Mc LEAN machte diese Beobachtung 1916 im Labor des Physiologen HOWELL bei Untersuchungen über die Thrombokinasaktivität von Phosphatiden der Hundeleber). Jedoch konnte JORPES in einer 1964 veröffentlichten Studie (2) zeigen, daß die Geschichte des Heparins bis auf das Jahr 1880 zurückgeht;

In diesem Jahr beobachtete der Veterinärmediziner SCHMIDT-MÜLHEIM (3; 3-13 und 15 zit. nach 2), daß das Blut des Hundes im Peptonschock (Folge intravenöser Injektion von 0,3 - 0,4 g WITTE-Pepton pro kg Körpergewicht) seine Gerinnbarkeit verliert - wie wir heute wissen, eine Wirkung aus der Leber freigesetzten (α -)Heparins. Der Aufklärung dieses Phänomens widmeten sich in den folgenden Jahren mehrere Arbeitsgruppen französischer Wissenschaftler:

Einen entscheidenden Fortschritt bedeutete zunächst die Feststellung von FANO (4) und GROSJEAN (5), daß es sich dabei um keinen direkten Effekt des Reptons, sondern um die Wirkung eines neugebildeten oder freigesetzten Antikoagulans handelte. In einer Reihe von Exstirpations- und Unterbindungsversuchen zeigten CONTEJEAN (6), GLEY und PACHON (7, 8), SPIRO und ELLINGER (9), HEDON und DELEZENNE (10), daß dieses Antikoagulans aus der Leber stammen müsse.

1911 stellten DOYON, MOREL und POLICARD (11) mit verschiedenen Methoden Leberextrakte her, deren wirksamster ein gleiches Volumen Blut ungerinnbar hielt. DOYON und POLICARD extrahierten das neu entdeckte Antikoagulans auch aus der Milz des Hundes und verschiedenen Organen des Kaninchens (12). 1912 veröffentlichte DOYON eine Zusammenfassung über die Beziehungen zwischen Leber und Blutgerinnung (13).

Diese Arbeiten waren HOWELL und McLEAN unbekannt, so daß sie sich für die Entdecker eines neuen organischen Antikoagulans halten mußten.

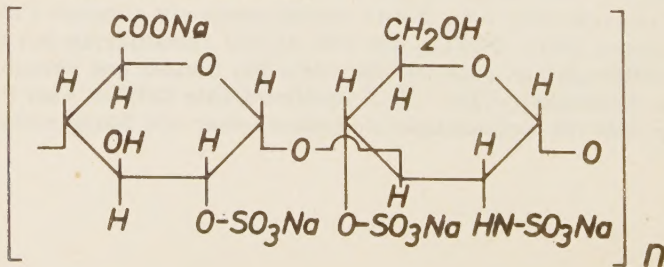
In den folgenden Jahren war McLEANS "Heparphosphatid" Gegenstand intensiver Arbeit im Labor HOWELLS. 1918 erschien eine Arbeit von HOWELL und HOLT (14), in der sie diesem Stoff den Namen "Heparin" gaben und bereits zwei seiner wesentlichen Eigenschaften beschrieben: seine Antithrombinwirkung und die Abhängigkeit dieser Wirkung von einem Plasmafaktor (von HOWELL "Proantithrombin" genannt). Über die chemische Zusammensetzung dieser Substanz bestanden lange Zeit einander widersprechende Ansichten:

- 1911 DOYON und Mitarb. (15): P-haltig, Nukleoproteid
 1916 Mc LEAN (1): Phosphatid
 1918 HOWELL und HOLT (14): Phosphatid
 1924 HOWELL (16): Kohlenhydrat, N-haltig, P-frei
 1928 HOWELL (17): Uronsäure, N-frei
 1933 FISCHER und SCHMITZ (18): Saures Kohlenhydrat,
 $C_{18}H_{32}O_{17} \cdot 6H_2O$
 1933 CHARLES und SCOTT (19): N- und S-haltig, keine Uronsäure,
 $C_{25}H_{65}O_{50}N_2S_5$

Im Jahre 1935 ermittelte schließlich JORPES die -wie wir heute wissen- wesentlichen Bestandteile des Heparins: Hexuronsäure, Glucosamin und Schwefelsäure in Esterbindung (20, 21). Die Glucuronsäurenatur der Hexuronsäure wurde vermutet (21). Da einige seiner Präparate auch Acetylgruppen enthielten, bezeichnete er das Heparin zunächst als Chondroitinrithschwefelsäure (20).

Im Jahre 1946 identifizierten WOLFROM und RICE (22) die Hescuronsäure entgültig als Glucuronsäure. WOLFROM und Mitarb. (23) sowie JORPES und Mitarb. (24) wiesen nach, daß ein Teil der Schwefelsäure des Heparins an die Aminogruppe des Glucosamins gebunden ist (Sulfonylamingruppe: $-NHSO_3H$).

Heparin (genauer: α -Heparin; über β -Heparin vgl. Seiten 9 und 10) kann heute definiert werden als hochmolekulares, saures Mucopolysaccharid, bestehend aus Sulfonylaminglucose und Glucuronsäuresulfat in α -glykosidischer ($1 \rightarrow 3$, $1 \rightarrow 4$) Bindung (dementsprechend optisch aktiv, und zwar rechts drehend):



Diese Definition ist nur eine grundsätzliche, denn es zeigte sich, daß Heparin kein einheitlicher Stoff ist:

Die von verschiedenen Tierarten, ja sogar die von verschiedenen Organen derselben Tierart mit dem gleichen Herstellungsverfahren gewonnenen Präparate zeigen große Unterschiede bezüglich Molekulargewicht (12 000 - 20 000), Veresterungsgrad (3-5 Moleküle Schwefelsäure auf 4 Kohlenhydratmoleküle), wobei die Stellung der Sulfatreste bis auf die Sulfonylamingruppe im einzelnen nicht gesichert ist) und gerinnungshemmender Wirkung [α -Heparin aus Hundeleber wirkt 10 mal stärker als α -Heparin aus Schafslunge (25)]. Nach JORPES (26) ist sogar das Heparin aus einem bestimmten Organ eines bestimmten Tieres nicht einheitlich, sondern ein Gemisch aus Heparinen mit unterschiedlichem Molekulargewicht, unterschiedlichem Schwefelgehalt und unterschiedlicher Aktivität [die analytische Auftrennung von Heparinmischungen kann durch Elektrophorese (27, 28, 29) oder Papierchromatographie (30) erfolgen].

Man ist daher für vergleichende Untersuchungen und die klinische Therapie auf die biologische Standardisierung angewiesen.

Um der verwirrenden Vielfalt der von den verschiedenen Autoren mit verschiedenen Verfahren definierten Heparineinheiten (31) ein Ende zu machen, führte man schließlich in der 1. Internationalen Pharmacopoe (32) die "Internationale Heparineinheit (I. E.)" ein:

1 I. E. entspricht der Wirkung von 7,7 γ des "Internationalen Heparin-standardpräparates".

Die 1. Internationale Pharmacopoe beschreibt ein genaues Verfahren zur Messung der Heparinaktivität an der Gerinnungszeit von Arterienblut der Katze. Es handelt sich bei diesem "Internationalen Standardheparin" um ein Präparat aus Rinderlungen. Es besitzt ein Molekulargewicht von ca. 12500 (39), einen Schwefelgehalt von 5 Molekülen Schwefelsäure (bzw. Na-Sulfat) auf 4 Kohlenhydratmoleküle und eine spezifische Drehung von $[\alpha]_D^{20} = + 50^\circ$.

Die Untersuchungen über die Beziehungen zwischen chemischer Struktur und gerinnungshemmender Wirkung hatten folgende Ergebnisse:

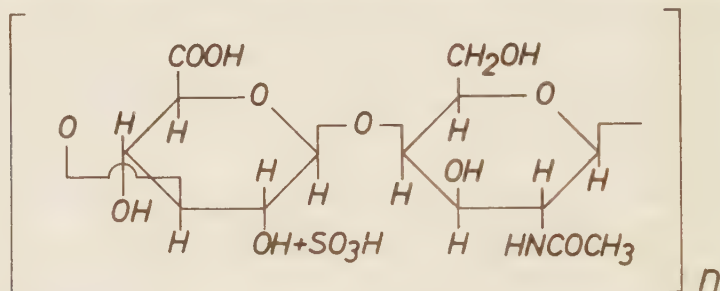
1. Entscheidend für die Wirkung ist die Schwefelsäure des Heparinmoleküls; Phosphorsäureester von Mucopolysacchariden haben keine Wirkung (33, 34).
2. Je höher das Molekulargewicht und der Veresterungsgrad, desto größer die Wirkung (25, 31, 33).
3. Die Sulfonylamingruppe verstärkt die Wirkung wesentlich (24).

2. und 3. fanden Bestätigung, als im Jahre 1951 MARBET und WINTERSTEIN (35) aus den Nebenprodukten der Heparinherstellung (einem Gemisch teils sulfatierter, teils unsulfatierter Mucopolysaccharide mit einer Aktivität von ca. 5 I. E. pro 1 mg) durch Zink-Methanolfällung ein Mucopolysaccharidpolysulfat mit einer Aktivität von 35 I. E. pro

1 mg isolierten. Es ist linksdrehend ($[\alpha]_D = -60^\circ$) und besitzt eine β -glykosidische Bindungsart. Es wurde von den Autoren daher β -Heparin genannt (das dem Standardheparin entsprechende Heparin trägt seitdem die Bezeichnung α -Heparin). Weitere chemische Unterschiede zum α -Heparin sind:

1. Es enthält Galaktosamin (nicht Glucosamin)
2. Die Aminogruppe ist nicht sulfonyliert, sondern azetyliert (wahrscheinlich enthielten die ersten Präparate von JORPES (20) neben α -Heparin auch β -Heparin).

Seine Konstitutionsformel wird von den Autoren wie folgt angegeben:



Durch "Nachsulfatierung" erhält das β -Heparin eine Aktivität, die mit 160 I. E. pro 1 mg höher ist als die des Internationalen Standardpräparates (36).

CIFONELLI und Mitarb. (37) identifizierten das β -Heparin mit der Chondroitinschwefelsäure B.

II. Darstellung, Nachweis, Vorkommen

Zur Darstellung größerer Mengen α -Heparin bedient man sich folgender Methode (31):

Das homogenisierte Gewebsmaterial wird mit Wasser extrahiert, wobei α -Heparin in Lösung geht. Der Großteil des mitextrahierten Proteins wird durch Hitzeaggregation oder fermentativ zerstört. Durch Behandlung des wässrigen Auszuges mit Äthanol erhält man ein Rohprodukt, in dem sich nach 90-95 % Ballaststoffe befinden.

Zur weiteren Reinigung werden die N- und P-haltigen Substanzen durch Metallsalze ausgefällt.

Aus dem Überstand wird Heparin mit Brucin, Quinin, oder Benzidin als schwerlösliches Salz ausgefällt. Schließlich wird α -Heparin als Barium-

salz auskristallisiert und das Barium noch durch Versetzen mit Natriumsulfat entfernt, so daß α -Heparin schließlich als Na-Salz vorliegt.

Der Nachweis des Heparins (bzw. der Heparine) erfolgt durch Bestimmung der gerinnungshemmenden Aktivität des Substrates oder durch Messung der Metachromasie, d.h. der Eigenschaft des Heparins (bzw. der Heparine) sich mit basischen Farbstoffen wie Toluidinblau, Azur A und Methylenblau nicht blau, sondern violett, d.h. unter Verschiebung zur kurzwelligen Seite des Spektrums anzufärben. Das Phänomen der Metachromasie ist allerdings nicht spezifisch für Heparin (bzw. die Heparine), es zeigt sich auch (38) bei anderen Polysaccharidpolysulfaten (wichtigste Vertreter dieser Stoffklasse im tierischen Körper sind neben den Heparinen die verschiedenen Chondroitinschwefelsäuren). Das Ausmaß der Metachromasie erlaubt bei den verschiedenen Heparinen keinen Schluß auf die gerinnungshemmende Aktivität des Stoffes, sie zeigt nur seine Konzentration an (25).

Mit diesen Methoden gelang es, Heparin bzw. Heparine in verschiedenen Organen und Tieren zu isolieren und nachzuweisen (39):

Organ bzw. Tier	Gehalt in g pro kg Trockenmasse
Mastocytom des Hundes	9
Hundeleber	3
Rinderlunge	2
Kaninchenlunge	0,5
Menschenlunge	0,25-1
Verschiedene Mollusken	0,5 - 1,75

Man fand, daß die Gewebsbasophilen (40) -die EHRlich'schen Mastzellen- und die mit ihnen möglicher- bis wahrscheinlicher Weise identischen basophilen Leukocyten des Blutes (41) in ihren metachromatischen Granula Heparin, bzw. Heparine enthalten, und daß die Heparine der verschiedenen Organe wahrscheinlich aus den Mastzellen stammen [(α -) Heparin- und Mastzellgehalt der Organe gehen parallel (43)]. Man hat die basophilen Leukozyten deshalb als "einzellige Heparindrüsen" und das Heparin als das physiologische Antikoagulans des Blutes bezeichnet.

Gerade über den normalen Heparinegehalt des Blutes und des Plasmas gehen aber die Angaben der verschiedenen Autoren weit auseinander (im folgenden wird, wie von den zitierten Autoren, auf die Unterscheidung zwischen α - und β -Heparin verzichtet):

MONKHOUSE und JAKES (43) fanden mit ihrer Methode [Phenolextraktion-Bestimmung des Heparins als Antithrombin (Antithrombintitration)] überhaupt kein Heparin im menschlichen Plasma.

ZÖLLNER und Mitarb. [Aminoacridinfällung - Bestimmung des Heparins als Ribonucleasehemmer (44)] und

GIBSON und Mitarb. [Fällung mit N-octylamin und Zinkhydroxyd - Bestimmung durch Antithrombination (46)] fanden im normalen Plasma des Menschen zwar metachromatische Substanzen in einer Höhe von 0,078 - 0,366 bzw. 0,02 - 0,45 mg pro 100 ml, bezeichnen diese aber als gerinnungsphysiologisch inaktiv.

Die Angaben der Autoren, die Heparin im Plasma nachweisen konnten, schwanken im Bereich von 2 Zehnerpotenzen (0,01 - 1 mg pro 100 ml Plasma):

KOLLATH und Mitarb. [(46), modifizierte Phenolextraktionsmethode nach (43)] : 1 I.E. pro 100 ml Humanplasma, entsprechend ungefähr 0,008 mg des Standardheparins.

JAQUES und Mitarb. [N-octylaminfällung (47)] : 0,01 mg pro 100 ml Plasma.

CHARLES und SCOTT (48): 6 I.E. pro 100 ml Plasma, entsprechend ungefähr 0,045 mg des Standardheparins.

WILANDER (27): 0,1 - 0,15 mg pro 100 ml Pferdeplasma.

ASTRUP (49): 0,1 mg pro 100 ml Menschenplasma.

ENGELBERG und Mitarb. [Methanol-Acetonfällung, Trypsinproteolyse - Bestimmung als Antikoagulans (50)]:

12 - 20 I.E. pro ml Humanplasma, entsprechend ungefähr 0,1 - 0,15 mg des Standardheparins.

LIBER und DANISHEFSKY [Isotopenmethode (51)]: 0,5 mg pro 100 ml Blut.

NILSSON und WENCKERT [Adsorption mit tertiärem Kalziumphosphat - Elution mit Natriumzitrat, N-octylaminfällung - Bestimmung des Heparins als Antithrombin und metachromatische Substanz (52)]: 0,2 - 0,4 bzw. - unter Berücksichtigung der Tatsache, daß mit der angegebenen Methode nur 20-40 % von zugesetztem α -Heparin wiedergewonnen werden konnten - 1 mg pro 100 ml Plasma.

Untersuchungen von ENGELBERG (50) lassen darauf schließen, daß das endogene Plasmaheparin an Eiweiß gebunden vorliegt. Vielleicht ist dies der Grund, daß einige Autoren mit ihren Methoden kein aktives Heparin im Plasma nachweisen konnten.

Allerdings läßt sich nach QUICK (53, S. 328) die Gerinnungszeit normalen Blutes durch Protaminsulfat verkürzen, was auf die Anwesenheit aktiven Heparins hindeuten könnte - es sei denn, man legt diesem Phänomen eine Direktwirkung des Protaminsulfates im Sinne einer Förderung der Blutgerinnung zugrunde.

Wenn aber über den normalen Gehalt des Blutes an Heparin bzw. Heparinen das letzte Wort noch nicht gesprochen ist - jedenfalls scheint er sehr gering zu sein-, so gibt es doch einige pathologische Zustände, in denen große Mengen von Heparin bzw. Heparinen im Blut vorhanden sind:

Die beim Hund im anaphylaktischen- und Peptonschock auftretende vollständige Ungerinnbarkeit des Halsvenenblutes beruht auf der Ausschüttung

von Heparin bzw. Heparinen (4-10, 17, 27, 54). JAKUES und WATERS (55) zeigten, daß das in anaphylaktischen Schock des Hundes freigesetzte Heparin aus den Mastzellen der Leber stammt. Sie fanden, daß

1. dabei die Blutgerinnungszeit durch Protaminsulfat normalisiert werden kann,
2. aus dem Blut Heparin als Bariumsalz in solchen Konzentrationen gewonnen werden kann, die auch in vitro für eine starke Hemmung der Blutgerinnung ausreichen,
3. nach einem solchen Schock die Mastzellen der Leber stark entgranuliert sind und
4. die Leber nur noch einen kleinen Teil ihres normalen Heparins enthält.

Auch nach intravenöser Injektion von Papain, nach wiederholter Gabe von N-Lost, bei Fruchtwasserembolie und nach Ganzkörper-Röntgenbestrahlung glauben einige Autoren (56, 57, 58, 59) beim Hund eine mehr oder weniger starke Hyperheparinämie beobachtet zu haben.

HENSEN und LOELIGER (60, S.41) berichten von Hyperheparinämien beim Menschen in einem Fall von Fruchtwasserembolie und in 2 Fällen von fortgeschrittenem Karzinom mit Lebermetastasen. Die stark verlängerte Thrombinzeit ließ sich in allen Fällen in vitro durch den Heparinantagonisten Polyprene normalisieren, in vivo allerdings nur in einem Fall [vom heutigen Stand der Kenntnisse aus wäre bei diesen Fällen auch an die Wirkung von Fibrin(ogen)-Abbau-Produkten (Antithrombin VI) zu denken].

KOLLATH und Mitarb. (46) fanden mit ihrer Bestimmungsmethode bei einer Mastzellenleukämie den Heparin Gehalt des Plasmas auf das Dreifache der Norm erhöht.

Fälle von "konstitutioneller Hyperheparinämie" wurden von HENI und KRAUS (61) und QUICK (53, S. 331) beschrieben;

Bei dem Fall von QUICK handelte es sich um eine Patientin mit einer seit früher Jugend bestehenden hämorrhagischen Diathese vom hämorrhagischen Typ. Die Blutungszeit war leicht, die Blutgerinnungszeit auf über 24 Stunden erhöht. Genauere Differenzierung ergab bei sonst normalem Gerinnungsstatus und nur leicht erhöhter Prothrombinzeit eine stark erhöhte Thrombinzeit, die sich in vitro durch Zusatz von Protaminsulfat normalisieren ließ. In vivo hatte dieser Heparinantagonist keine Wirkung. Bei den Fällen von HENI und KRAUS handelte es sich um eine hämorrhagische Diathese bei Vater und Tochter, charakterisiert durch eine stark erhöhte Thrombinzeit, die sich in vitro und in vivo durch Heparinantagonisten normalisieren ließ (wünschenswert wäre es künftig bei Fällen von Hyperheparinämie, Heparin durch Adsorption an tertiäres Kalziumphosphat aus Oxalatplasma zu isolieren und sicherer als solches zu charakterisieren).

III. Wirkungen

Die chemisch, oder besser physico-chemisch hervorstechendste Eigenschaft der Heparine ist ihre negative elektrische Ladung - die stärkste aller organischer Verbindungen.

Vielleicht ist es diese Polyanionstruktur, die besonders für die vielfältigen Wirkungen des Heparins bzw. der Heparine verantwortlich ist.

1. Wirkung auf die einzelnen Phasen der Blutgerinnung

Die am längsten bekannten (11, 14) und vielleicht wichtigste Wirkung des (α -)Heparins auf eine einzelne Phase der Blutgerinnung ist seine Wirkung auf die 2. Phase, seine Antithrombinwirkung. Diese läßt sich durch Messung der Thrombingerinnungszeit von Plasma leicht und genau ermitteln. Dieser Test dient daher in der Klinik auf Empfehlung von R. MARX (62) besonders zur Kontrolle der Heparintherapie.

Für seine Antithrombinwirkung benötigt das (α -)Heparin einen Plasmabestandteil, den sog. Heparincofaktor (Näheres vgl. den zweiten Hauptteil der Arbeit).

Auch die "Prothrombinzeit" in der Einphasenmethode nach QUICK wird verlängert, allerdings wesentlich weniger stark als die Thrombinzeit, weil die Testthrombokinasen heparin-antagonistisch wirkt. Diese Verlängerung der Gerinnungszeit im "Prothrombintest" nach QUICK beruht jedoch nicht auf einer Hemmung des Prothrombins, wie noch HOWELL (14, 16) annahm (das Heparin führte deshalb in seinem Labor in den Jahren 1916-1918 die Bezeichnung 'Antiprothrombin'), sondern auf einer Hemmung des Faktors V (63).

Vielleicht beruht aber auch dieser Effekt auf einer Antithrombinwirkung, da man seit OWRENS Arbeit (64) weiß, daß Faktor V durch kleine Mengen Thrombin aktiviert wird.

Durch Hemmung von Faktor VIII, Faktor IX und Faktor XI (PTA, ROSENTHAL-Faktor) und des "Kontakt-Faktors" [Faktor XI + Faktor XII (HAGEMAN-Faktor)] wird die Plasmathrombokinasenbildung gestört (63).

Auch die Wirkung der Gewebsthrombokinasen wird durch Heparin bzw. Heparine gehemmt (65, 66).

Interessant ist in diesem Zusammenhang eine Beobachtung von MARBET und WINTERSTEIN (66):

β -Heparin aus Rinder- und Schafslunge besitzt (an den entsprechenden Wirkungen des Standardheparins gemessen) eine viel kleinere Antithrombokinasen- als Antithrombinwirkung, d.h. die Wirkung auf die verschiedenen Phasen der Blutgerinnung geht bei den verschiedenen Heparinen nicht parallel.

Die Wirkung des Heparins auf die Blutgerinnung läßt sich durch organische, aminogruppenhaltige Basen wie Protaminsulfat (ein stark basisches Polypeptid), Tolnidinblau (und ähnliche Farbstoffe), Antihistaminica (67, 68) und Polybrene (eine polymere quartäre Ammoniumbase) hemmen und in geeigneter Dosis (z. B. 1,3 mg Protaminsulfat bzw. 1 mg Polybrene pro 1 mg α -Heparin) in vitro und in vivo völlig neutralisieren. Es handelt sich dabei wahrscheinlich um Säure-Basen-Reaktionen mit Bildung schwer löslicher Salze (69).

Auch die Gewebsthrombokinase kann die Antithrombinwirkung des Heparins im Plasma abschwächen (70, 71). QUICK jedoch fand im System Fibrinogen-Thrombin-Heparin keine Abschwächung der Antithrombinwirkung des Heparins durch Gewebsthrombokinase (72).

Ein "physiologisches Antiheparin" ist der Thrombozytenfaktor 4 [über seine Eigenschaften und ein diskutiertes, mit ihm nicht identisches Serum-Antiheparin s. (63)].

2. Wirkung auf die Fibrinolyse

Über eine mit dem Blutgerinnungsvorgang in enger Beziehung stehende Wirkung des Heparins, seine fibrinolysefördernde Wirkung lassen die von verschiedenen Autoren mit verschiedenen Methoden gewonnenen Resultate kein ganz klares Bild aufkommen:

Keine Verstärkung der fibrinolytischen Aktivität von Plasma auf Fibrinplatten aus thrombingeronnenem trockenen Rinderfibrinogen, bei hohen Heparinkonzentrationen sogar eine Hemmung, auf Platten aus geronnenem Humanplasma jedoch eine deutliche Verstärkung der Fibrinolyse (73).

Auf ASTRUP-MÜLLERTZ-Platten in kleinen Dosen Verstärkung der fibrinolytischen Aktivität einer eingesetzten Euglobulinlösung, in höheren Dosen wieder ein Rückgang dieser Wirkung, in noch höheren Dosen eine Hemmung der Fibrinolyse (74, 75, 76).

Deutliche Verkürzung der Euglobulinlysiszeit (76, 77, 78) und Förderung der Fibrinolyse in mit Heparin bebrüteten Gerinnseln aus rekalkifiziertem Zitratplasma (79).

Mit menschlicher Urokinase und Euglobulinen als Enzymsystem und Platten aus Rinderfibrin und menschlichem Plasma als Substrat in hohen Dosen Hemmung, in niedrigen Dosen Förderung der Fibrinolyse (80).

Es sieht also so aus, als wäre die Wirkung des Heparins auf das fibrinolytische System eine doppelgesichtige:

In "reinen" Systemen und hohen Dosen Hemmung der Fibrinolyse durch Plasminhemmung, in Systemen mit in-vivo-nahen Bedingungen und kleinen Dosen Förderung der Fibrinolyse, vermutlich durch Aktivierung des Fibrinolytinsins bzw. Profibrinolytinsins [(81, S. 36), (83)] oder durch Aktivierung der Fibrinolytinskinase (77).

Die fibrinolysefördernde Wirkung des Heparins ist unabhängig von seiner gerinnungshemmenden Wirkung (74): α -Heparin soll hierin vom β -Heparin und der praktisch gerinnungsneutralen Chondroitinschwefelsäure A übertroffen werden.

3. Wirkung auf die Plasmalipide

Im Jahre 1943 machte HAHN (83) die Beobachtung, daß sich beim Hund die alimentäre, zur Plasmatrübung führende Lipämie durch intravenöse Heparininjektion beseitigen läßt. Dieser "clearing-effect" ist auch bei anderen Versuchstieren und beim Menschen nachzuweisen. Er ist der makroskopische Ausdruck einer feineren Dispersion der Chylomikronen, verbunden mit einer Verschiebung des Lipoprotein-Spektrums von höheren zu niedrigeren Sf-Klassen (84, 85) und einer Abnahme des Gehaltes des Plasmas an Triglyzeriden mit Auftreten von Glyzerin und freien Fettsäuren (84). Diese Veränderungen sind die Wirkung einer durch Heparin aus dem Gewebe freigesetzten und aktivierten Lipoproteinlipase (Heparin in vitro hat keine Klärwirkung auf lipämisch getrübt Plasma). Manche Autoren z.B. ZÖLLNER und Mitarb. (86) halten zumindest den ersten Teil der Klärreaktion (die feinere Verteilung der Chylomikronen) für einen physikalischen oder physiko-chemischen Vorgang (Herabsetzung der Oberflächenspannung der Chylomikronen durch Heparin).

Nicht nur die Neutralfett enthaltenden, sondern auch die Cholesterin transportierenden Lipoproteine werden durch Heparin beeinflusst: Bei essentieller xanthomatöser Hypercholesterinämie wurde von WINTERSTEIN (39) eine mit einer deutlichen Senkung des Cholesteringehaltes des Plasmas verbundene Verminderung der pathologisch erhöhten β -Lipoproteine nach α -Heparininjektion beschrieben.

Diese "lipolytische" Wirkung des Heparins gab Anlaß zu Hoffnungen im Hinblick auf das Arterioskleroseproblem:

Tatsächlich läßt sich im Tierversuch die durch Cholesterindiät derzeugbare Arterio-Atherosklerose durch Heparin (und Heparinoide) verhindern (85, 87). ENGELBERG (29) beobachtete eine signifikante Steigerung der Überlebensrate von Postinfarktpatienten, die über größere Zeiträume mit kleinen, gerinnungsphysiologisch nur wenig wirksamen α -Heparinmengen (2 mal 200 mg pro Woche) behandelt wurden [an diesem Effekt könnte auch die vasodilatatorische und antihypertensive Wirkungskomponente des Heparins (s. S. 18) beteiligt sein].

Zwischen lipolytischer und gerinnungshemmender Aktivität besteht nach ZÖLLNER und Mitarb. (86) und KONSTANTINIDES und Mitarb. (89) keine Parallelität: Gerinnungsphysiologisch relativ wenig wirksame α -Heparinabbauprodukte und Heparinoide haben praktisch die gleiche lipolytische Aktivität wie α -Heparin.

4. Wirkung auf verschiedene Enzyme

Heparin vermag -allerdings teilweise in unphysiologisch hoher Dosis- eine ganze Reihe von Enzymen zu hemmen, wahrscheinlich durch Verschiebung ihres isoelektrischen Punktes:

Fumarase (90),

Hyaluronidase [(91); wegen der chemischen Verwandtschaft zur Hyaluronsäure vielleicht durch kompetitive Hemmung],

Lysozym (92),

hämolytisches Komplement (93),

Ribonuclease (94),

alkalische und saure Phosphatase (95),

β -Amylase (96) und

verschiedene Proteasen wie Pepsin (97), Kathepsin (98), Trypsin (99) und Chymotrypsin (99).

Vielleicht gehört in diesen Wirkungsbereich des Heparins, bzw. der Heparine (Änderung spezifischer Eigenschaften von Proteinen durch Änderung der elektrischen Ladung) auch seine protektive Wirkung gegenüber dem anaphylaktischen Schock (100, 101). Sie ist unabhängig von der gerinnungshemmenden Aktivität des Heparins (102). Ob sie durch Bindung des Histamins zustande kommt, erscheint fraglich; Im Blut des Hundes im Peptonschock finden sich große Mengen von Heparin bzw. Heparinen und Histamin nebeneinander, ohne sich in ihrer Aktivität zu beeinflussen. JÜRGENS (101) glaubt die schockverhütende Wirkung des (α -)Heparins durch Bindung von Antikörpern erklären zu können.

5. Wirkung auf das Bindegewebe und die Blutgefäße

Therapeutische Erfolge mit (α -)Heparin in kleinen, quoad coagulationem unwirksamen Dosen wurden bei einer ganzen Reihe von entzündlichen und degenerativen Bindegewebskrankheiten beschrieben:

Arthrosis deformans (102),

rheumatischem Fieber (103),

primär chronischer Polyarthritits (104) und

Gicht (104).

Bezüglich des Wirkungsmechanismus bei diesen Erkrankungen kann über den Hinweis auf die chemische Verwandtschaft des Heparins mit Bestandteilen der Bindegewebsgrundsubstanz, seine hyaluronidasehemmende, sowie seine eventuell fibrinolysefördernde Wirkung hinaus nichts Genaues ausgesagt werden.

Der 1933 von GODLOWSKY (105) zum ersten Mal beschriebene antihypertensive Effekt des Heparins wurde in neuerer Zeit in vielen tierexperimentellen und klinischen Untersuchungen (106, 107, 108, 109, 110, 111)

bestätigt. Zu seiner Erklärung bieten sich an

1. die aldosteronantagonistische, natriuretische Wirkung des α -Heparins (112, 113, 114), wobei als Angriffspunkt einerseits eine Hemmung des die Aldosteronsekretion stimulierenden Renin-Angiotensin-Systems (113), andererseits auch eine Blockierung der Aldosteronsynthese in der Nebennierenrinde auf einer nicht genau definierten Stufe zwischen Corticosteron und 18-Hydroxycorticosteron (115) diskutiert wird
2. seine -wahrscheinlich periphere- vasodilatatorische Wirkung (116, 117).

Letztere ist wohl auch verantwortlich für die therapeutischen Erfolge bei Morbus RAYNAUD (117) und Angina pectoris (85, 119).

IV. Verhalten exogenen α -Heparins im Körper

1. Resorption

α -Heparin (und Heparinoide) erscheinen bei peroraler Applikation nicht in wirksamer Form im Blut. Die Ursache hierfür liegt entweder in einer Zerstörung (Depolymerisierung) durch die Salzsäure des Magens oder in ihrem hohen Molekulargewicht, das eine Resorption verhindern könnte.

2. Elimination

Bei intravenöser Gabe verschwindet Heparin im Laufe einiger Stunden aus dem Blut [3 mg pro kg Körpergewicht nach ca. 8 Stunden beim Menschen, bzw. nach 5 Stunden beim Hund (120)].

Diese Elimination aus dem Blut erfolgt auf 2 Wegen:

1. Ausscheidung im Urin;

Nach 24 Stunden finden sich 30-50 % der zugeführten Heparinmenge im Urin (31, 120, 121, 122) und zwar mit einer Aktivität von $1/2 - 1/3$ (122) - $1/5$ (31) des applizierten Heparins. Dieser Aktivitätsverlust ist nicht durch Desulfurierung, sondern durch Depolymerisierung bedingt (122). JAQUES (123) gab den ausgeschiedenen Heparinbruchstücken den Namen "Uroheparin". Diese Depolymerisierung erfolgt wahrscheinlich durch ein Leberferment, die sog. Heparinase (124). Protaminsulfat - gebundenes Heparin erscheint nicht im Urin; es wird im Körper festgehalten und vollständig abgebaut (122).

2. Speicherung:

Nach 24 Stunden finden sich etwa 30 % des zugeführten Heparins in der Leber (121). Das gespeicherte Heparin wird im Verlaufe von etwa 1 Woche dann doch noch im Urin ausgeschieden (120, 121), wobei im Blut aber keine meßbaren Konzentrationen mehr auftreten.

Einige Heparinoide werden von bestimmten Organen bestimmter Tiere länger gespeichert [Milz von Kaninchen und Ratte bis zu 3 Monaten (125)].

Der Nachweis des Heparins im Urin kann außer durch die schon erwähnten Methoden der Antithrombintitration und der Metachromasiebestimmung auch nephelometrisch [Ausfällung des Heparins mit Dimethylaminomethyl-dibenzofuran, Messung der Trübung (122)] oder bei Verwendung von 35 S-markiertem α -Heparin durch Messung der Radioaktivität (120, 121, 125) erfolgen.

Zum Nachweis von Heparinen und Heparinoiden in tierischen Organen bedient man sich vor allem der Messung der Metachromasie und des Antithrombintiters des nach einer Heparinengewinnungsmethode (vgl. S. 7) aufgearbeiteten Substrates oder der Messung der Radioaktivität des Organs nach Applikation von radioaktivem α -Heparin oder Heparinoid (86).

B. SPEZIELLER TEIL

Heparincofaktor und Antithrombin III

I. Diskussion von Eigenschaften und gegenseitiger Beziehung der beiden Stoffe anhand der Literatur

Seit der grundlegenden Arbeit von HOWELL und HOLT (14) weiß man, daß α -Heparin seine Antithrombinwirkung nicht direkt entfaltet, sondern nur in Kombination mit einem Plasmafaktor. Da HOWELL von der Vorstellung ausging, daß dieser Plasmafaktor vom Heparin zum eigentlichen wirksamen Antithrombin aktiviert wird, nannte er ihn Proantithrombin. Andere Synonyma sind: Heparin-Komplement, Antithrombin II, Heparin-Coinhibitor und Heparin-Cofaktor (Heparincofaktor; im folgenden unter der Abkürzung HCF).

Schon die ersten Beobachtungen HOWELLS ließen darauf schließen, daß es sich dabei um ein Protein handelt:

HOWELL fand (14), daß das Proantithrombin durch Hitze inaktiviert

wird und sich mit Ammoniumsulfat bei Halbsättigung ausfällen läßt.

Über die genaue Lokalisation des HCF in der Skala der Plasmaproteine und über seine Beziehung zum Antithrombin III ist aber bis heute keine endgültige Klarheit gewonnen worden (Antithrombin III, auch "antithrombine naturelle", "physiological antithrombin" oder "Progressiv-antithrombin" genannt, ist dadurch charakterisiert, daß im Gegensatz zum sofort wirkenden α -Heparin-HCF-Komplex seine Wirkung mit zunehmender Zeitdauer seiner Inkubation mit Thrombin zunimmt): Einige Autoren halten Antithrombin III und HCF für identisch und vermuten, daß das Antithrombin III durch α -Heparin zum "Sofortantithrombin" (Antithrombin II) aktiviert wird.

Schon HOWELLS Theorie über die Wirkungsweise des Heparins (s.o.) beinhaltet die Identität von HCF und natürlichem Antithrombin.

QUICK (127; 38, S. 326) fand beide Substanzen in der durch Ammoniumsulfatfällung isolierten Albuminfraktion und hält sie für identisch. Nachdem es sich aber herausstellte, daß reines, kristallisiertes Albumin keine Aktivität besitzt (128, 129), nannte er den HCF Albumin X.

In neuerer Zeit veröffentlichten BURSTEIN und LOEB mehrere Arbeiten (130, 131) mit einer Reihe von Beobachtungen, aus denen sie auf eine Identität der beiden Substanzen schließen:

1. Beide lassen sich durch die gleichen Konzentrationen von Ammoniumsulfat, Methanol und Äthanol ausfällen.
2. Beide sind adsorbierbar mit tertiärem Kalziumphosphat und Aluminiumhydroxyd, nicht adsorbierbar mit Bariumsulfat, Kaolin und Magnesiumoxyd.
3. Beide werden im Laufe der Gerinnung verbraucht.
4. Beide werden durch Erhitzen (30 Minuten bei $+65^{\circ}\text{C}$) zerstört.
5. Beide werden durch Zusatz von 10 % Äther, Chloroform und Amylalkohol zerstört.
6. Beide sind in gleicher Konzentration in COHN-Fraktion IV₁ enthalten und in 1/4 dieser Konzentration auch in COHN-Fraktion III₀ (diese Fraktionen bestehen aus α - und β -Globulinen).

Letzteres entspricht einem Befund von HENSEN und LOELIGER (60):

Diese adsorbierten hitzedefibrinogenisiertes EDTA-Plasma mit Aluminiumhydroxyd, eluierten das Aluminiumhydroxydadsorbat mit Phosphatpuffer, fraktionierten das Eluat durch Stärkegelelektrophorese und gewannen so ein Präparat, das HCF und Antithrombin III in gleicher Konzentration enthielt und das aus α -Globulin bestand.

Eine ganze Reihe von Autoren spricht sich jedoch gegen eine Identität von HCF und Antithrombin III aus:

ASTRUP und DARLING (132, 133), sowie VOLKERT (134) fanden beide Substanzen in den durch Ammoniumsulfatfällung gewonnenen Albuminen, aber doch in verschiedenen Fraktionen.

LYTTLETON (135) isolierte sie durch Stärkegelelektrophorese in der α_2 -Globulinfraktion, fand aber Unterschiede in der Thermostabilität und im Grad ihrer Inaktivierbarkeit durch große Mengen von Thrombin.

LEWIS und Mitarb. (136) glauben, durch Elektrophorese die beiden Substanzen getrennt zu haben, wenn auch die Unterschiede zwischen den betreffenden Fraktionen gering waren.

II. Experimenteller Teil

1. Versuch einer Lokalisation der beiden Stoffe in den Plasmaproteinen und ihrer Differenzierung

Aufgabe des folgenden ist es, die mittels eines von KNEDEL und SPERTL (137) angegebenen präparativen Elektrophoreseverfahrens mit Kartongpapier als Trägermaterial getrennten Plasmaeiweißfraktion auf ihren Gehalt an Heparincofaktor und Antithrombin III zu untersuchen, d.h. sie im Spektrum der Plasmaproteine zu lokalisieren und, wenn möglich, zu trennen.

a. Methodik

Messung der Blutgerinnung.

Stäbchendurchzugsmethode im Rundkolbenthermostaten nach R. MARX und BAYERLE (138) bei 37°C.

Zitratplasma (falls nicht anders angegeben):

1 Teil Natriumzitrat (3,8 %ig) auf 4 Teile Venenblut (gesunder Versuchspersonen), 20 Minuten bei 4 000 U/min zentrifugiert.

Oxalatplasma:

1 Teil Natriumoxalat (1,34 %ig) auf 9 Teile Venenblut, 20 Minuten bei 4 000 U/min zentrifugiert.

α -Heparinlösung:

Heparin NOVO (im folgenden abgekürzt als HN), 100 I.E./mg, in 0,9 %iger NaCl-Lösung.

Heparinoidlösung:

Substanz gelöst in 0,9 %iger NaCl-Lösung.

Thrombinlösung:

TOPOSTASIN "ROCHE" (im folgenden abgekürzt als TR) und Testthrombin "BEHRING WERKE" (im folgenden abgekürzt als TB), gelöst in 0,9 %iger NaCl-Lösung, während der Versuche bei + 6°C in Eiswasser gehalten (das bisher zur Methodik gesagte gilt auch für die Experimente des zweiten Hauptteiles).

Bestimmungsmethode für den Heparincofaktor (HCF)

Prinzip:

Messung der Sofortantithrombinwirkung des α -Heparins in einem System, das durch Thrombin zur Gerinnung gebracht werden kann und für sich allein keinen (oder möglichst wenig) Heparincofaktor enthält.

Auf ihren Gehalt an HCF wurden folgende Systeme untersucht:

1. Zitratplasma, 2 mal adsorbiert mit tertiärem Kalziumphosphat bzw. Bariumsulfat
2. Oxalatplasma, 2 mal adsorbiert mit tertiärem Kalziumphosphat $[\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2]$, bzw. Bariumsulfat (BaSO_4)
3. Euglobulinlösung
4. Rinderfibrinogen "BEHRINGWERKE"
5. Fibrinogen nach KEKWICK (139), hergestellt im Labor von R. MARX
6. COHN-Fraktion I.

1.

Adsorptionsmethode:

Plasma wird 10 Minuten lang mit Bariumsulfat bzw. tertiärem Kalziumphosphat "MERCK" (200 mg pro 1 ml Plasma) geschüttelt; Adsorbens abzentrifugiert (20 Minuten lang bei 4000 U/min).

Ansatz:

0,2 ml Zitratplasma

0,1 ml NaCl (0,9 %ig)-, bzw. α -Heparinlösung

0,2 ml Thrombinlösung (TR, 10 N.I.H.E. pro 1 ml)

γ /Ansatz	Gerinnungszeit (GZ) in sec für Plasma		
	nicht adsorbiert	adsorbiert mit BaSO_4	adsorbiert mit $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$
0	14,7	14,3	14,5
0,25	38,7	42,1	42,9
0,51	68,2	75,6	75,1
1	>120	>120	>120

2.

Adsorptionsmethode wie oben.

Ansatz:

0,2 ml Oxalatplasma

+0,1 ml NaCl (0,9 %ig)-, bzw. α -Heparinlösung

+0,2 ml Thrombinlösung (TR, 10 N.I.H.E. pro 1 ml)

HN γ /Ansatz	GZ in sec für Plasma		
	nicht adsorbiert	adsorbiert mit Ba SO_4	adsorbiert mit $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$
0	13,0	13,1	13,4
0,25	35,5	38,9	13,5
0,5	65,1	71,4	13,6
1	>120	>120	14,8
5	-	-	17,2
25	-	-	18,9
100	-	-	20,3

3. Euglobulinlösung

Herstellung:

0,5 ml (bzw. ein Vielfaches) Zitratplasma werden mit 8 ml (bzw. einem Vielfachen) Aqua dest. und 0,15 ml (bzw. einem Vielfachen) 1 %iger Essigsäure versetzt und 30 Minuten bei $+4^\circ$ inkubiert.

Der Niederschlag wird abzentrifugiert und gelöst im ursprünglichen Plasmavolumen einer Mischung aus 2/10 Natriumzitrat (3,8 %ig), 2/10 Veronalacetatpuffer (PH 7,6) und 6/10 NaCl-Lösung (0,9 %ig).

Ansatz:

0,2 ml Euglobulinlösung

+0,1 ml NaCl (0,9 %ig)-, bzw. α -Heparinlösung

+0,2 ml Thrombinlösung (TR, 10 N.I.H.E. pro 1 ml)

HN γ /Ansatz	GZ in sec für	
	Charge A	Charge B
0	13,9	12,8
1	18,3	13,0
5	21,8	15,4
25	22,7	18,7
100	24,1	19,4

4. Rinderfibrinogen "BEHRINGWERKE"

Ansatz:

0,2 ml Rinderfibrinogen BEHRINGWERKE (0,6 %ig)
 +0,1 ml NaCl (0,9 %ig)-, bzw. α -Heparinlösung
 +0,2 ml Thrombinlösung (TR, 10 N.I.H.E. pro 1 ml)

HN γ /Ansatz	GZ in sec für	
	Charge 690	Charge 703 A
0	11,3	11,7
1	15,0	25,4
5	15,7	30,7
25	19,1	36,3
100	27,6	-

5. Fibrinogen nach KEKWICK

Ansatz:

0,2 ml Fibrinogen "KEKWICK" (aus Kaninchenplasma)
 +0,1 ml NaCl (0,9 %ig)-, bzw. α -Heparinlösung
 +0,2 ml Thrombinlösung (TR, 10 N.I.H.E. pro 1 ml)

HN γ /Ansatz	GZ in sec
0	11,4
1	19,3
5	14,4
25	10,9
100	10,1

6. COHN-Fraktion I

Herstellung:

Zitratplasma wird auf -2°C abgekühlt und bis zu einem Endgehalt von 8 % mit 99 %igem unvergälltem Äthylalkohol versetzt (d.h. z.B. 23 ml Plasma mit 2 ml Äthylalkohol). Der Niederschlag wird in der Kühlzentrifuge bei -2° abzentrifugiert und mit einem Gemisch aus 8 % Äthylalkohol (99 %ig) in 0,9 %iger NaCl-Lösung (Temperatur -2°C) gewaschen, d.h. aufgeschwemmt und wieder abzentrifugiert. Der Niederschlag wird zum Schluß bei Zimmertemperatur (bei Temperaturen um

den Gefrierpunkt nur sehr schlechte Löslichkeit) gelöst im ursprünglichen Plasmavolumen eines Gemisches aus 4 Teilen 0,9 %iger NaCl-Lösung und 1 Teil 3,8 %iger Natriumzitratlösung.

Ansatz:

0,2 ml COHN-Fraktion I

+0,1 ml NaCl (0,9 %ig)-, bzw. α -Heparinlösung

+0,2 ml Thrombinlösung (TR, 10 N.I.H.E. pro 1 ml)

HN	GZ in sec für COHN-Fraktion I		
Ansatz	1 mal gewaschen	2 mal gewaschen	3 mal gewaschen
0	12,5	12,3	12,6
1	18,9	17,1	16,8
5	25,3	17,3	15,9
25	37,3	17,4	13,9
100	43,4	18,2	13,7

Ergebnis:

Der HCF läßt sich nur mit tertiärem Kalziumphosphat aus Oxalatplasma adsorbieren, allerdings nicht vollständig.

Von den durch Fällungsmethoden gewonnenen Fibrinogenpräparaten war keine vollständig frei von HCF. Den geringsten HCF-Gehalt zeigten das Fibrinogen nach KEKWICK und die 3 mal gewaschene Charge der COHN-Fraktion I.

Fibrinogen nach KEKWICK erwies sich aber in unseren Testen als relativ unbeständig: Es kam immer wieder zu Spontangerinnungen im vorbereiteten UHLENHUTH-Röhrchen.

Als Testsystem für die Bestimmung des HCF wurde daher die 3 mal gewaschene COHN-Fraktion I verwendet. Um die durch die Pufferlösung verdünnten Proteinfractionen nicht durch das Lösungsmedium der COHN-Fraktion I noch weiter zu verdünnen, wurde die nach dem beschriebenen Verfahren hergestellte Lösung von COHN-Fraktion I in Einzelportionen von 1 ml lypophilisiert (Vakuum-Gefriertrockner der Firma CHRIST) und jeweils in 1 ml der zu untersuchenden Proteinfraction wieder gelöst.

Fibrinogen nach KEKWICK und die 3 mal gewaschene HCF-ärmste Charge der COHN-Fraktion I zeigten ein eigenartiges Phänomen: Die Thrombinzeit ließ sich in diesen beiden Systemen mit Heparin nur bis zu einem bestimmten Endwert steigern; bei noch höheren Heparindosen ergab sich wieder eine Verkürzung der Thrombinzeit, die bei Fibrinogen nach KEKWICK mit 25 und 100% Heparin pro Ansatz sogar eine absolute war.

Dies läßt sich so erklären, daß die in diesen Fibrinogensystemen noch enthaltene, geringe Menge HCF eine Verlängerung der Thrombinzeit

nur bis zu jenem Endwert ermöglicht, und daß darüber hinaus zugesetztes Heparin nicht mehr als Antithrombin wirken kann, sondern in unspezifischer Reaktion wie alle hochmolekularen Substanzen die Thrombinzeit verkürzt.

Bestimmungsmethode für Antithrombin III

Prinzip:

Bestimmung der Eigenschaft des Antithrombin III, bei Inkubation mit Thrombin dieses mit zunehmender Dauer der Inkubation in zunehmendem Maße ("progressiv") zu inaktivieren.

Ausführung:

Gleiche Teile des zu untersuchenden Substrates und einer Thrombinlösung (TB, 60 N.I.H.E. pro 1 ml) werden gemischt und bei 37° inkubiert. In bestimmten Zeitabständen werden 0,2 ml dieses Gemisches entnommen und damit 0,2 ml einer 0,6 %igen Fibrinogenlösung (Rinderfibrinogen BEHRINGWERKE) zur Gerinnung gebracht.

Plasmafraktionierung nach dem Verfahren von KNEDEL und SPERL (137)

Prinzip:

Papierelektrophorese mit Baumwollkarton als Trägermaterial. Von dem Karton mit den aufgetrennten Fraktionen wird auf dünnem Filtrierpapier gleichen Formates ein Abklatsch angefertigt und das auf ihn übertragene Proteinspektrum wie bei der analytischen Papierelektrophorese durch Färbung mit Amidoschwarz sichtbar gemacht. Entsprechend diesem Abklatsch wird der Karton in einzelne Streifen zerschnitten und die in ihnen enthaltenen Fraktionen mit einer hydraulischen Presse ausgepreßt.

Technische Einzelheiten:

Puffer: Veronalazetatpuffer nach MICHAELIS, PH 8,6; 1:1 mit Aqua dest. verdünnt.

Diese Pufferlösung verlängert die Thrombinzeit geringgradig. Da sie aber in allen Fraktionen enthalten ist, wurde auf Dialyse verzichtet.

Laufzeit: 15 Stunden

Spannung: 240 V

Karton: MN 866

Aufgetragene wurden: 2,4 ml Zitratplasma durch Erhitzen (5 Minuten bei +56°C) von Fibrinogen (Antithrombin I) befreit.

Daß durch dieses Verfahren der HCF nicht zerstört wird, geht aus folgendem Versuch hervor:

Ansatz:

0,2 ml lypophilisierte COHN-Fraktion I, gelöst in

+ a. 0,2 ml Zitratplasma bzw.

b. 0,2 ml Zitratplasma, durch Erhitzen (+ 56° C für 5 min) defibrinogenisiert

+ 0,1 ml NaCl (0,9 %ig)-, bzw. α -Heparinlösung

+ 0,2 ml Thrombinlösung (TR, 10 N.I.H.E. pro 1 ml)

HN γ /Ansatz	GZ in sec	
	a	b
0	11,7	12,9
0,25	28,5	29,8
0,5	90,1	93,3
1	>120	>120

Weitere technische Einzelheiten wie Apparatur, Auftragsmodus und Abklatschverfahren können der Originalarbeit von KNEDEL und SPERL (137) entnommen werden.

b. Durchführung der Versuche

Um einen Überblick über die Lokalisation beider Substanzen zu erhalten, zerschnitten wir den Karton zunächst so, daß Albumin und die 4 Hauptfraktionen der Globuline (α_1 , α_2 , β und γ) jeweils auf einen Streifen zu liegen kamen.

Ansatz für die Bestimmung des HCF:

0,2 ml (COHN-Fraktion I + Proteinfraction)

+ 0,1 ml NaCl (0,9 %ig)-, bzw. α -Heparinlösung

+ 0,2 ml Thrombinlösung (TR, 10 N.I.H.E. pro 1 ml)

Ansatz für die Bestimmung des Antithrombin III:

0,2 ml Fibrinogenlösung

+ 0,2 ml (Proteinfraction + TB-Lösung, 60 N.I.H.E. pro 1 ml, zu gleichen Teilen)

Streifen-Nr.	Fraktion	HCF		Antithrombin III	
		HN μ / Ansatz		Inkubationszeit in min	
		0	2	1	6
		Gerinnungszeit in sec		Gerinnungszeit in sec	
	Pufferlösung	14,0	15,2	7,6	7,5
1	Albumine	13,9	15,1	7,6	7,8
2	α_1 -Globuline	13,8	15,3	7,6	7,4
3	α_2 -Globuline	13,8	20,4	8,3	11,2
4	β -Globuline	14,0	19,8	8,5	10,9
5	γ -Globuline	13,7	15,1	7,7	7,4

Ergebnis:

Heparincofaktor -und Antithrombin III-Aktivität liegen- ohne sicheren quantitativen Unterschied- in den Streifen 3 und 4, d.h. in der α_2 - und der β -Globulinfraction.

Durch den Trennschnitt zwischen diesen beiden Streifen bzw. Fraktionen wurde offenbar ein Teil der aktiven Substanz der α_2 -Fraktion, der andere der β -Fraktion zugeteilt.

Im Hauptversuch wurde daher die Fraktionierung verfeinert, d.h. in Abständen von 1 cm geschnitten (s.S. 29).

Streifen-Nr.	Fraktion	HCF		Antithrombin III	
		HN	γ /Ansatz	Inkubationszeit in min	
		0	2	1	6
		Gerinnungszeit in sec		Gerinnungszeit in sec	
	Pufferlösung	13,9	15,0	7,6	7,6
1	Albumin	14,1	15,1	7,4	7,7
2	Albumin	13,9	14,8	7,7	7,5
3	Albumin	13,8	14,9	7,6	7,6
4	Albumin	13,7	15,0	7,6	7,7
5	Zwischenstück	13,9	15,2	7,5	7,4
6	α_1 -Globuline	14,0	14,8	7,7	7,4
7	α_2 -Globuline	13,9	24,7	8,7	16,3
8	α_2 -Globuline	14,1	27,2	9,1	19,7
9	Zwischenstück	13,8	23,8	8,6	16,0
10	β -Globuline	14,2	15,3	7,4	7,6
11	β -Globuline	13,9	14,7	7,7	7,5
12	Zwischenstück	13,8	15,1	7,5	7,5
13	Zwischenstück	14,3	14,8	7,6	7,4
14	γ -Globuline	13,7	15,0	7,7	7,4
15	γ -Globuline	13,9	15,2	7,4	7,5

Ergebnis:

Heparincofaktor und Antithrombin III finden sich in der α_2 -Globulinfraktion und im Zwischenstück zur β -Globulinfraktion, beide mit der größten Aktivität in Streifen 8, d. h. im langsamer wandernden Teil der α_2 -Globulinfraktion.

Die im Hauptversuch gegenüber dem Vorversuch höhere Aktivität, d. h. Konzentration der beiden Substanzen erklärt sich aus der differenzierten Schnittführung:

Beim Vorversuch war die aktive Substanz auf 5,5 cm (2 cm α_2 -Globuline; 3,5 cm β -Globuline) verteilt, im Hauptversuch dagegen nur auf 3 cm (2 cm α_2 -Globuline; 1 cm Zwischenzone).

2. Die Wirkung des Antihistaminicums ANTISTIN^R auf α -Heparin, verschiedene Heparinoide, Antithrombin III und Thrombin

Im Jahre 1951 beschrieben HALEY und STOLARSKI (67) den Antagonismus zwischen Antihistaminica und (α -)Heparin. 1956 zeigte ZÜRN (68), daß einige Antihistaminica (darunter auch das ANTISTIN^R, N-benzyl-N-phenyl-2-imidazolino-methylamin als Methylsulfonat) außer dem α -Heparin auch das Antithrombin III antagonisieren und in geeigneter Dosis völlig hemmen.

Unter Reproduktion der Versuche ZÜRNs und Einbeziehung verschiedener Heparinoide versuchten wir im folgenden, den Angriffspunkt des ANTISTIN^R im System Thrombin-Antithrombin zu ermitteln.

1. Wirkung des ANTISTIN^R auf α -Heparin und verschiedene Heparinoide

α -Heparin: Heparin NOVO, 100 I. E. pro mg.

Von Heparinoiden gelangten zur Untersuchung:

Heparinoid GEIGY (G 31150, enthalten in HEMERAN^R, ein Pektinpolyschwefelsäureester),

Heparinoid BAYER (Versuchspräparat, enthalten in LASONIL^R),

ELEPARON^R (LUITPOLD-WERKE, ein Mucoitinpolyschwefelsäureester, strenggenommen - s. S. 34- kein Heparinoid, sondern ein Heparinkörper) und THROMBOCID^R (BENE-CHEMIE, ein Pentosanpolyschwefelsäureester).

Ansatz:

0,2 ml Zitratplasma

+0,1 ml NaCl (0,9 %ig)-, bzw. α -Heparin-, bzw. Heparinoidlösung

+0,2 ml Thrombinlösung (TR, 10 N. I. H. E. pro 1 ml)

A: ohne ANTISTIN^R

B: 0,1 mg ANTISTIN^R pro Ansatz

C: 0,5 mg ANTISTIN^R pro Ansatz

D: 2 mg ANTISTIN^R pro Ansatz

	γ /Ansatz	A	B	C	D
		Gerinnungszeit in sec			
-	0	13,7	13,2	13,0	12,1
Heparin NOVO	0,5	>120	113,6	20,0	12,1
Heparinoid BAYER	5	>120	>120	51,6	12,4
Heparinoid GEIGY	25	>120	59,3	21,4	14,0
ELEPARON ^R	25	>120	65,5	24,5	14,4
THROMBOCID ^R	25	34,7	26,1	17,7	13,1

2. Wirkung des ANTISTIN^R auf Antithrombin III

Ansatz:

0,2 ml Fibrinogenlösung (Rinderfibrinogen BEHRINGWERKE 0,6 %ig)

+0,2 ml (hitzedefibriniertes, menschliches Zitratplasma + Thrombinlösung, TR 50 N.I.H.E. pro 1 ml, zu gleichen Teilen)

A: ohne ANTISTIN^R

B: 0,2 mg ANTISTIN^R pro Ansatz

C: 2 mg ANTISTIN^R pro Ansatz

Inkubationszeit in min	A	B	C
	Gerinnungszeit in sec		
2	13,8	7,1	gerinnt sofort
4	37,3	15,5	6,1
6	68,1	36,3	7,3
8	>120	61,8	9,2
10	>120	>120	11,4

Ergebnis:

Die Antithrombinwirkung des α -Heparin und der untersuchten Heparinoide sowie die Wirkung des Antithrombin III wird durch ANTISTIN^R gehemmt, in geeigneter Dosis sogar aufgehoben.

Dieser Effekt beruht nicht auf einer Verschiebung des PH-Wertes (PH der ANTISTIN^R-Lösung: 6,4; PH der verwendeten Thrombin- und Heparin-, bzw. Heparinoidlösungen: 6,2).

Auch andere, vor allem als Heparinantagonisten bekannte Substanzen [z. B. das Toluidinblau (72)] hemmen außer der Antithrombinwirkung des α -Heparins auch die Wirkung des Antithrombin III.

Dies könnte als ein weiterer Beweis für die Identität von Heparincofaktor und Antithrombin III gewertet werden. Es gibt jedoch Hinweise dafür, daß das ANTISTIN^R nicht den Heparincofaktor (und dadurch die Antithrombinwirkung des α -Heparins und der verschiedenen Heparinoide) und das Antithrombin III angreift, sondern am Thrombin selbst wirkt und es gegen die Einwirkung dieser Substanzen stabilisiert:

1. ANTISTIN^R hemmt (s. S. 31) auch die Antithrombinwirkung des "Heparinoids BAYER", die -wie aus Untersuchungen des zweiten Hauptteils der Arbeit hervorgeht- vom Heparincofaktor praktisch unabhängig ist.

2. R. MARX beobachtete (140), daß sich die bekannte zeit- und temperaturabhängige proteolytische Selbstinaktivierung gelösten Thrombins durch ANTISTIN^R verringern bzw. verzögern läßt.

Folgende Versuche mögen dies zeigen:

Ansatz:

0,2 ml Zitratplasma

+0,2 ml Thrombinlösung (TR, 5 N.I.H.E. pro 1 ml) verschiedenen Alters.

Thrombinlösung inkubiert bei + 4° C	Alter der Thrombinlösung in h				
	0	24	48	60	84
	Gerinnungszeit in sec				
ohne ANTISTIN ^R	17,6	19,5	19,9	32,3	48,1
50 mg ANTISTIN ^R pro 1 ml	16,1	16,3	16,5	20,4	22,1

Thrombinlösung inkubiert bei + 20° C	Alter der Thrombinlösung in h				
	0	24	48	60	84
	Gerinnungszeit in sec				
ohne ANTISTIN ^R	17,6	17,7	21,8	29,3	29,5
50 mg ANTISTIN ^R pro 1 ml	16,2	16,4	16,4	19,5	21,4

Ansatz:

0,2 ml Fibrinogenlösung (Rinderfibrinogen BEHRINGWERKE 0,6 %ig)

+0,2 ml Thrombinlösung (TR, 5 N.I.H.E. pro 1 ml) verschiedenen Alters

Thrombinlösung inkubiert bei + 4° C	Alter der Thrombinlösung in d			
	0	2	3	11
	Gerinnungszeit in sec			
ohne ANTISTIN ^R	11,1	12,2	12,2	14,5
50 mg ANTISTIN ^R pro 1 ml	11,0	11,1	11,3	12,6

Thrombinlösung inkubiert bei + 20° C	Alter der Thrombinlösung in d			
	0	2	3	11
	Gerinnungszeit in sec			
ohne ANTISTIN ^R	12,4	12,6	18,3	>120
50 mg ANTISTIN ^R pro 1 ml	10,1	10,4	11,6	25,3

III. Zusammenfassendes Ergebnis der experimentellen Untersuchungen des ersten Hauptteiles

1. Heparincofaktor und Antithrombin III wurden mit der von uns verwendeten Methode (vgl. Seiten 21 - 27: Präparative Kartonpapierelektrophorese nach KNEDEL und SPERL -COHN-Fraktion I als Testsystem für den Heparincofaktor- Rinderfibrinogen BEHRING-WERKE als Testsystem für Antithrombin III) im langsam wandernden Bereich der α_2 -Globuline gefunden.
Eine Trennung der beiden Substanzen gelang nicht:
Beide hatten ihre größte Aktivität in derselben Unterfraktion.
2. Die Antithrombinwirkung von α -Heparin und verschiedenen Heparinoiden sowie die Wirkung des Antithrombin III wird durch das Antihistaminicum ANTISTIN^R (N-benzyl-N-phenyl-2-imidazolomethylamin) gehemmt, in geeigneter Dosis aufgehoben.
Da ANTISTIN^R auch die Antithrombinwirkung eines vom Heparincofaktor praktisch unabhängigen Heparinoids ("Heparinoid BAYER", vgl. experimentelle Untersuchungen des zweiten Hauptteiles) hemmt und einen stabilisierenden Effekt auf Thrombin in wässriger Lösung besitzt (R. MARX), wird vermutet, daß der Angriffspunkt dieser Substanz am Thrombin liegt.

ZWEITER HAUPTTEIL:

BEITRÄGE ZUM MECHANISMUS DER WIRKUNG VON HEPARINOIDEN IM BLUTGERINNUNGSSYSTEM

A. ALLGEMEINER TEIL

Heparinoide

I. Definition des Begriffes

Der Begriff "Heparinoide" wurde von R. MARX (141) eingeführt. Man versteht darunter die halbsynthetischen Schwefelsäurepolyester $(R-O-SO_3H)_n$ langkettiger organischer Verbindungen vom Typ der Polysaccharide, Polyuronsäuren und Mucopolysaccharide (also heparin-ähnlich gebaute Verbindungen) mit heparinähnlicher Wirkung. Die Polysulfate der (Aminogruppen-haltigen) Mucopolysaccharide wurden von R. MARX (147) unter der Bezeichnung "Heparinkörper" als eigene Gruppe abgetrennt.

Eine erweiterte Definition (142) umfaßt dazu noch die vollsynthetischen Polysulfate anderer veresterbarer polymerer organischer Verbindungen (z. B. des Polyvinylalkohols) und die vollsynthetischen oder halbsynthetischen Sulfonsäurederivate $(R-SO_3H)_n$ polymerer organischer Verbindungen (z. B. die Polyanetholsulfonsäure und die Polyäthylensulfonsäure).

Seit langer Zeit kennt man auch die gerinnungshemmende Wirkung von sulfonsäurehaltigen Verbindungen wie GERMANIN^R (ein symmetrisch gebautes Harnstoffderivat mit einem Molekulargewicht von 1428), CHICAGO-BLAU^R und BENZECHT ROSA^R. Diese Verbindungen haben bis auf den Schwefelgehalt, die negative Ladung und das relativ hohe Molekulargewicht mit Heparin keine Ähnlichkeit mehr; für die Anti-koagulantientherapie besitzen sie keine Bedeutung:

Beim GERMANIN^R steht die trypanozide Wirkung im Vordergrund, bei den zwei letzteren verbietet der Farbstoffcharakter die Anwendung beim Menschen.

II. Geschichte

Stoffe, die wir heute als Heparinoide bezeichnen würden, wurden zum ersten Mal im Jahre 1928 von GEBAUER-FÜLNEGG und Mitarb. (143) und TRAUBE und Mitarb. (144) beschrieben. Es handelte sich dabei um Polysulfate der Zellulose. Ihre gerinnungshemmende Wirkung wurde damals nicht erkannt. Im Jahre 1930 berichteten DEMOLE und REINERT (145) über die heparinähnliche Wirkung der Polyanetholsulfonsäure, eines chemisch nicht ganz genau definierten Nebenproduktes der Herstellung von Sulfitzellulose. Den entscheidenden Anstoß erhielt die Erforschung der Heparinoide durch die Untersuchungen von JORPES und seiner Arbeitsgruppe zur Reindarstellung und Strukturermittlung des Heparins. Auf Anregung von JORPES synthetisierte und beschrieb BERGSTRÖM (146) 1936 eine ganze Reihe von "Polysaccharidschwefelsäureestern mit Heparinwirkung". Bis heute wurden über 1000 (142) Heparinoide synthetisiert und in vitro, tierexperimentell und zu einem kleinen Teil auch klinisch geprüft.

III. Wirkungen

Es zeigt sich, daß die Heparinoide viele wichtige Eigenschaften und Wirkungen des Heparins (bzw. der Heparine) besitzen:
 Hemmung der Blutgerinnung in allen ihren Phasen
 Thrombozytenagglomeration (147)
 Aktivierung des fibrinolytischen (81, 82) und des lipolytischen (148, 149, 150) Systems des Blutes,
 Hemmung verschiedener Enzyme wie Hyaluronidase (151, 152) und Lezithase (153)
 bei sofortigem Wirkungseintritt und kurzer Wirkungsdauer.
 Wie vom α -Heparin (s. S. 17) werden von den Heparinoiden -außer bei den nun schon klassischen Indikationen Thrombose, Embolie und Hyperlipämie- auch noch bei einer Reihe von Bindegewebskrankheiten therapeutische Erfolge beschrieben:
 Arthrosis deformans (154),
 Paratenonitis crepitans (155),
 Gicht und primär chronischer Polyarthrit (104).
 Die blutdrucksenkende Wirkung von Heparinoiden (156) läßt sich wie die des α -Heparins z. T. durch ihren aldosteronblockierenden, natriuretischen Effekt (112, 113, 114, 115, 157) erklären. Bemerkenswerterweise findet sich dieser Effekt deutlich ausgeprägt auch bei Heparinoiden und dem α -Heparin verwandten Substanzen wie dem N-formyl-chitosan-

polysulfat, ROCHE-Präparat Ro 1-8307 (112, 113, 114, 115, 157) und den verschiedenen Chondroitinschwefelsäuren (114), die fast keine (Ro 1-8307; Chondroitinschwefelsäure A) oder eine im Vergleich zum α -Heparin geringe (Chondroitinschwefelsäure B = β -Heparin) gerinnungshemmende Wirkung besitzen.

Heparinoide lassen sich wie die Heparine metachromatisch anfärben. Ihre Wirkung auf die Blutgerinnung kann durch die Antagonisten des α -Heparins aufgehoben werden.

Zwischen chemischer Struktur und gerinnungshemmender Wirkung besteht dieselbe Beziehung wie bei den verschiedenen Heparinen:

Je höher das Molekulargewicht und der Veresterungsgrad, desto größer die Wirkung (158, 159); Sulfaminsäuregruppen erhöhen die Wirkung (160).

Unverzweigte, gestreckte Moleküle ("Fadenmoleküle") wie Zellulose, Chondroitinschwefelsäure und Pektin liefern aktivere Ester als verzweigte Moleküle wie Glykogen (161) - ein Zusammenhang, den man natürlich bei den verschiedenen, stets unverzweigten Heparinen nicht beobachten kann.

Im einzelnen aber ergeben sich gewisse Unterschiede:

Es gibt Heparinoide (wie den Pentosanpolyschwefelsäureester THROMBOCID^R bzw. SP 54^R), die nur ca. 1/3 (THROMBOCID^R) bzw. noch weniger (SP 54^R) der gerinnungshemmenden Wirkung eines α -Heparins bestimmter Aktivität besitzen, dieses aber an fibrinolytischer (82) und lipolytischer (148, 149, 150) Wirkung erreichen und in bestimmten Konzentrationsbereichen übertreffen sollen.

Manche Heparinoide beeinflussen -im Vergleich zu einem α -Heparin bestimmter Aktivität- die verschiedenen Phasen der Blutgerinnung verschieden stark:

So besitzt ein bestimmtes Alginsäurepolysulfat eine Antithrombokinaseaktivität von 15 % derjenigen des α -Heparins, während seine Wirkung auf die Gesamtblutgerinnung nur etwa 5 % der entsprechenden Wirkung des α -Heparins erreicht (162). Die Ester der Zellulose, der Stärke (163) und des Dextrans (164) haben bei deutlicher Wirkung auf die Gesamtblutgerinnungs- und Thrombinzeit praktisch keine Antithrombokinasewirkung. Ein Pektinsulfat (GEIGY-Präparat G 31150 "Heparinoid GEIGY") hat eine relativ stärkere Antihumanthrombokinase - als Antithrombinwirkung (165). R. MARX empfiehlt daher (166) zur Erfassung der Heparinoidwirkung die Kontrolle der Gesamtblutgerinnungs-, Thrombin-, Prothrombin- und Rekalzifizierungszeit, BELLER dazu noch das Thrombelastogramm (167).

Es handelt sich bei den geschilderten Unterschieden aber um keine grundsätzlichen:

Auch bei den verschiedenen Heparinen besteht zwischen der gerinnungshemmenden Wirkung einerseits und der problematischen fibrinolytischen

und der lipolytischen Wirkung andererseits kein Zusammenhang (vgl. Seiten 15 und 16); ebenso besteht zwischen der Wirkung auf die verschiedenen Phasen der Gerinnung bei den verschiedenen Heparinoiden keine Parallelität (vgl. Seite 15).

Ein wesentlicher -und vor allem für die Klinik bedeutsamer- Unterschied zwischen α -Heparin und vielen Heparinoiden besteht jedoch in deren Nebenwirkungen. Diese Nebenwirkungen sind der Grund, weshalb die Heparinoide trotz geringerer Kosten und im wesentlichen heparinähnlicher Wirkung das α -Heparin in der Antikoagulantientherapie nicht ersetzen konnten;

Außer den auch beim α -Heparin zu beobachtenden Alopecien und anaphylaktischen Reaktionen, sieht man bei manchen Heparinoiden auch toxische Wirkungen:

Ein Präparat (der Schwefelsäurepolyester des Polygalakturonsäuremethylglycosids), das vom Versuchstier noch in einer Dosis von 4 g pro kg i. v. gut vertragen wird, führt beim Menschen in tausendmal geringerer Dosis zu toxischen Erscheinungen; blutige Durchfälle, Abmagerung und Beeinträchtigung der Nierenfunktion (168). Hier zeigte sich wieder einmal, daß Ergebnisse von Tierversuchen nicht ohne weiteres auf den Menschen übertragen werden können.

Nach Vorbehandlung mit Bakterienendotoxin erzeugt die intravenöse Gabe von Polyanetholsulfonsäure (LIQUOID^R) beim Kaninchen ein Erscheinungsbild, das an die generalisierte SWARTZMAN-Reaktion erinnert: Abfall des Fibrinogenspiegels im Blut, fibrinoide Ablagerungen in den Nierenkapillaren mit Nekrosen im Nierengewebe (169). Einige Autoren (170, 171) beschreiben beim Meerschweinchen eine anaphylaktoide Reaktion (Kollaps, Krämpfe, Dyspnoe) nach einmaliger Gabe eines Heparinoids, d. h. eine primäre Überempfindlichkeit.

Bestimmte Heparinoide wie das Dextransulfat führen nicht nur in vitro (158, 159), sondern auch in vivo zur Fibrinogenausfällung [Nachweis durch metachromatische Ablagerungen an den Gefäßwänden (171)].

ASTRUP rechnet (173) unter die toxischen Manifestationen der Heparinoide auch ihre Fähigkeit der Thrombocytenagglomeration.

Verstärkt wird die Toxizität einiger Präparate vom Typ der Sulfonsäurederivate (Polyanetholsulfonsäure = LIQUOID^R) noch durch deren gegenüber dem α -Heparin und den Heparinoiden im engeren Sinne langen Wirkungsdauer. MARBET und WINTERSTEIN (122) erklären dies durch folgende Annahme:

Der chemische Unterschied dieser Verbindungen zum Heparin ist so groß (Fehlen der glycosidischen Bindungsart?), daß die körpereigene Heparinase (vgl. Seite 18) sie nicht zu spalten, d. h. zu depolymerisieren vermag.

Da die perkutane Resorption von Heparinoiden sehr gering ist (174, 175), verwendet man Heparinoide der oben beschriebenen Art zur Lokaltherapie von oberflächlichen Thrombophlebitiden, Phlebothrombosen und

Ulcera cruris (LASONIL^R, HEMERAN^R, PERGALEN^R), wobei neben der gerinnungshemmenden und fibrinolytischen auch die antiphlogistische Wirkung der Heparinoide (Hyaluronidasehemmung!) eine Rolle spielen soll.

Zwischen Toxizität und chemischer Struktur bestehen Zusammenhänge: Je höher das Molekulargewicht und der Veresterungsgrad, desto höher die Toxizität. Ein Beispiel hierfür ist das Dextransulfat:

Dextransulfatfraktionen, die nach Molekulargewicht, Veresterungsgrad und gerinnungshemmender Wirkung dem Heparin gleichkommen, besitzen eine so hohe Toxizität, daß sie klinisch nicht verwendet werden können. Dextransulfatfraktionen mit einem Molekulargewicht von 7000-8000 besitzen bei geringerer aber noch deutlicher Wirkung eine gute Verträglichkeit (158, 159).

Man verwendet daher heute in der Antikoagulantientherapie Heparinoide mit einem relativ niedrigen Molekulargewicht oder verzichtet auf eine wesentliche gerinnungshemmende Wirkung zugunsten der fibrinolytischen und lipolytischen Aktivität (z. B. SP 54^R mit einem Molekulargewicht von ca. 2000).

Der Vorteil der Heparinoide gegenüber dem Heparin liegt einmal in ihrem niedrigeren Preis, der durch die relativ einfachere, mechanisierbare Herstellung ermöglicht wird. Man bedient sich dazu im allgemeinen folgender Methoden:

Zunächst werden die hochmolekularen Ausgangsstoffe, die teilweise eine Kettenlänge bis zu 300 (Stärke) oder bis zu 1500 (Zellulose) Monosaccharideinheiten besitzen, bis zur Kettenlänge des Heparins (α -Heparin aus Rinderlungen ca. 40 Monosaccharideinheiten) oder noch weiter abgebaut. Diese Depolymerisation erfolgt entweder enzymatisch (Hyaluronidase, Pektinase, Dextranase) oder hydrolytisch (durch Kochen bei verschiedenem PH-Wert) oder oxydativ (Halogene, H₂O₂ usw.). Zur Sulfatierung verwendet man rauchende Schwefelsäure, Schwefeltrioxyd oder Chlorsulfonsäure in Pyridin oder Formamid als Lösungsmittel [Einzelheiten s. R. PULVER (142)].

Auf diese Weise lassen sich -ein weiterer Vorteil der Heparinoide- je nach Synthesegang Substanzen mit ganz bestimmten Eigenschaften herstellen. Außerdem erhält man durch ein bestimmtes Verfahren immer ein konstantes, chemisch einheitliches (einheitliches Ausgangsmaterial vorausgesetzt) und genau definiertes Produkt, so daß sich die biologische Standardisierung jeder neuen Charge erübrigt und nach Gewicht dosiert werden kann.

B. SPEZIELLER TEIL

I. Eine Theorie von R. PULVER über den Wirkungsmechanismus der Heparinoide

Über den Wirkungsmechanismus der Heparinoide, d. h. vor allem über den Wirkungsmechanismus ihrer Antithrombinaktivität wurde bisher allgemeindie Ansicht vertreten, daß sich die Heparinoide wie das α -Heparin mit dem Heparincofaktor (HCF) zu einem gerinnungsaktiven Heparinoid-HCF-Komplex mit Sofortwirkung verbinden. Diese Theorie ist in anbetracht der nahen chemischen Verwandtschaft zwischen Heparin und Heparinoiden wohl plausibel, aber eigentlich nicht experimentell gestützt.

Dagegen vertrat in neuerer Zeit R. PULVER (176, 177, 178, 179) die Ansicht, daß die Heparinoide nicht direkt, sondern indirekt durch Freisetzung von endogenem, an ein Trägerprotein in nicht aktiver Form gebundenem α -Heparin wirken. Diesen gerinnungsphysiologisch inaktiven α -Heparin-Protein-Komplex nennt er "Heparinogen". Zwar sollen auch die Heparinoide mit dem HCF reagieren, doch sei dieser Heparinoid-HCF-Komplex unwirksam.

Nach R. PULVER stehen sich also vier Faktoren gegenüber:

α -Heparin (endogenes oder zugesetztes)

Heparinoid

Heparincofaktor (HCF) und

Trägerprotein,

die nach folgenden Gleichungen miteinander in Reaktion treten:

a.) Heparinogen $\rightleftharpoons \alpha$ -Heparin + Trägerprotein

b.) Heparinoid + Trägerprotein $\rightleftharpoons$ Heparinoid-Trägerprotein

c.) α -Heparin + HCF $\rightleftharpoons \alpha$ -Heparin-HCF-Komplex

d.) Heparinoid + HCF $\rightleftharpoons$ Heparinoid-HCF-Komplex

Aus a.) und b.) ergibt sich:

e.) Heparinogen + Heparinoid $\rightleftharpoons \alpha$ -Heparin + Heparinoid-Trägerprotein

Aus c.) und d.) ergibt sich:

f.) α -Heparin-HCF + Heparinoid $\rightleftharpoons \alpha$ -Heparin + Heparinoid-HCF

Die für die Theorie R. PULVERs entscheidenden Gleichungen sind die Gleichungen e.) und c.):

Heparinogen + Heparinoid $\longrightarrow$ Heparinoid-Trägerprotein + α -Heparin

α -Heparin + HCF $\longrightarrow \alpha$ -Heparin-HCF (mit Antithrombinwirkung).

Für seine Theorie führt R. PULVER folgende Versuchsergebnisse an:

1.) Es gelang ihm, aus Rattenleber ein Protein darzustellen, das Heparin unter Inaktivierung bindet. Aus diesem α -Heparin-Protein-Komplex kann α -Heparin durch Heparinoide freigesetzt werden (177). Als Versuchssystem diente eine HCF-arme Mischung aus 1 Teil Zitratplasma und 3 Teilen COHN-Fraktion I. In diesem System, das mit Thrombin zur Gerinnung gebracht werden kann, ergab der α -Heparin-Protein-Komplex keine, der Pektinpolyschwefelsäureester G 31150 nur eine sehr schwache Antithrombinwirkung, während der α -Heparin-Proteine-Komplex zusammen mit dem Heparinoid eine starke Antithrombinwirkung entfaltete.

Dieses Protein aus Rattenleber bezeichnet R. PULVER als ein Modell des hypothetischen Trägerproteins im "Heparinogen".

2.) Die Heparinoide hemmen bei genügend hoher Dosierung in einem HCF-armen Gerinnungssystem (1 Teil Zitratplasma plus 4 Teile COHN-Fraktion I), in dem sie selber nur eine schwache Antithrombinwirkung haben, die Antithrombinwirkung des α -Heparins, d.h. sie reagieren mit dem HCF (kompetitive Hemmung des HCF durch Heparinoide). Sie haben aber in dem sehr HCF-armen System der reinen COHN-Fraktion I auch nach Zusatz eines nach einer von R. PULVER (176) entwickelten Methode hergestellten HCF-Präparates keine Antithrombinwirkung. Die Heparinoide benötigen also nach R. PULVER außer dem HCF noch einen Faktor, der in der reinen Cohnfraktion nicht enthalten ist und den er mit dem "Heparinogen" identifiziert.

3.) Der Antithrombineffekt der Heparinoide läßt sich auch mit hohen Dosen nicht über einen bestimmten Endwert steigern, der einer Aktivität von 0,4 - 0,6 mg zugesetzten α -Heparins (Aktivität 100 I.E. pro 1 mg) pro 100 ml Zitratplasma entspricht. Bei noch höheren Heparinoidmengen ergeben sich Thrombinzeiten, die wieder kürzer sind als jene maximale Thrombinzeit. Die Verkürzung der Thrombinzeit bei weiterer α -Heparinzugabe nach Erreichen des Maximalwertes erklärte R. PULVER als unspezifischen Effekt; Auch andere hochmolekulare kolloidale Substanzen vermögen die Thrombinzeit zu verkürzen, ohne selbst gerinnungsaktiv zu sein. Nach Erschöpfung des Heparinogens würden die Heparinoide nur noch als unspezifische kolloidale Substanzen wirken (176, 177).

4.) Die Wirkung eines Gemisches von α -Heparin und Heparinoiden, gemessen an der Rekalzifizierungszeit von Zitratblut, ist keine einfach additive, sondern eine überadditive (potenzierte). Die pharmakologischen Begriffe "additiv" und "überadditiv (potenziert)" seien kurz erläutert:

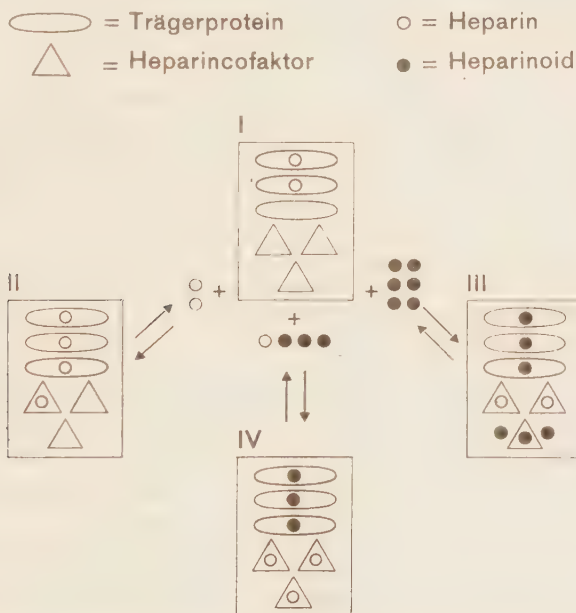
Von zwei Stoffen, deren Wirkung sich in einem bestimmten Test synergistisch verstärkt, läßt sich jeweils die Menge (A und B) ermitteln, die

allein in dem Test eine bestimmte Wirkung (W) entfaltet. Bei der Kombination von jeweils der Hälfte dieser Mengen gibt es für die Wirkungsstärke nun zwei Möglichkeiten;

- 1.) $1/2 A + 1/2 B = W$: additive Wirkung
- 2.) $1/2 A + 1/2 B > W$: potenzierte Wirkung.

PULVER erklärt die potenzierte Wirkung von α -Heparin-Heparinoidgemischen im Rekalkifizierungstest von Zitratblut dadurch, daß die Heparinoide einmal α -Heparin aus dem "Heparinogen" freisetzen, zum anderen freies α -Heparin (zugeordnetes und aus dem "Heparinogen" freigesetztes) vor der Bindung an das inaktivierende Trägerprotein bewahren, indem sie aufgrund ihrer chemischen Verwandtschaft zum α -Heparin die Haftstellen des Trägerproteins besetzen.

Unter Annahme eines molaren Verhältnisses von "Heparinogen": Trägerprotein: HCF = 2 : 1 : 3 entstehen nach folgendem Schema [R. PULVER, Abb. 3 aus (179)]



aus eingesetzten 3 (inaktiven) Heparinoidäquivalenten zusammen mit 1 (inaktiven) α -Heparinäquivalent 3 (aktive) α -Heparin-HCF-Äquivalente.

II. Diskussion der Theorie R. PULVERs und Untersuchungen über die Heparincofaktorabhängigkeit und Heparincofaktoraffinität verschiedener Heparinoide

Prinzipiell ist ein derartiger Wirkungsmechanismus der Heparinoide denkbar. Er würde etwa dem Wirkungsmechanismus des Ephedrin und anderer Phenylisopropylamine entsprechen:

Diese Stoffe entfalten ihre adrenalinähnlichen Wirkungen nicht direkt (am isolierten, und denervierten Organ sind sie unwirksam), sondern einmal dadurch, daß sie aufgrund ihrer nahen chemischen Verwandtschaft zum Adrenalin und Noradrenalin diese Substanzen aus den chromaffinen Granula im Nebennierenmark und in den sympathischen Nerven verdrängen und damit freisetzen, zum anderen dadurch, daß sie die Monoaminoxidase, die Adrenalin und Noradrenalin abbaut, kompetitiv hemmen, d. h. aufgrund ihrer chemischen Verwandtschaft zum Adrenalin und Noradrenalin (160).

Nun zu den einzelnen Punkten der Theorie R. PULVERs:

Ad 1.):

Auf eine Darstellung des Trägerproteins aus Rattenleber wurde verzichtet. Daß sich das α -Heparin mit einer ganzen Reihe basischer Proteine und Polypeptide wie Pepton, Histon, Trypsin und Hämoglobin verbinden kann, ist schon längere Zeit bekannt (69, 181). Auch die mit Inaktivierung verbundene Koppelung des α -Heparins an Leberglobuline wurde schon beschrieben (182). JAKUES hält die Bindung des α -Heparins an basische Proteine für eine Säure-Basen-Reaktion. Auch die Inaktivierung des Heparins durch das basische Polypeptid Protamin erfolgt höchstwahrscheinlich nach diesem Mechanismus.

Ad 2.):

Zunächst untersuchten wir -wie R. PULVER (176)- die Antithrombinwirkung verschiedener Heparinoide im Gerinnungssystem Cohnfraktion I -Thrombin bei steigendem Zitratplasma- (d. h. HCF-, nach R. PULVER auch Heparinogen-) Gehalt.

R. PULVER verwendete für seine Versuche ein α -Heparin mit einer Aktivität von 100 I. E. pro 1 mg und folgende Heparinoide:

"Heparinoid GEIGY" (s. S. 30) und die Polyschwefelsäureester von Xylan, Dextran und Chondroitinschwefelsäure. Wir verwendeten für unsere Versuche ebenfalls ein α -Heparin mit einer Aktivität von 100 I. E. pro 1 mg (Heparin NOVO^R; im folgenden abgekürzt als HN)

und folgende Heparinoide:

"Heparinoid GEIGY" (s. S. 30; im folgenden abgekürzt als HG),

"Heparinoid BAYER" (s. S. 30; im folgenden abgekürzt als HB),

ELEPARON^R (s. S. 30; im folgenden abgekürzt als E) und

THROMBOCID^R (s. S. 30; im folgenden abgekürzt als TH).

Versuchsansatz:

0,2 ml Gerinnungsgemisch

a. 0,2 ml COHN-Fraktion I

b. 0,18 ml COHN-Fraktion I + 0,02 ml Zitratplasma

c. 0,16 ml COHN-Fraktion I + 0,04 ml Zitratplasma

d. 0,1 ml COHN-Fraktion I + 0,1 ml Zitratplasma

e. 0,2 ml Zitratplasma

+0,1 ml NaCl (0,9 %ig)-, bzw. Testsubstanzlösung

+0,2 ml Thrombinlösung (TR, 10 N.I.H.E. pro 1 ml)

In diesem Versuchsansatz zeigten die untersuchten Substanzen folgende Gerinnungszeiten:

Heparin NOVO^R

Dosis in γ pro Ansatz	Gerinnungszeit in sec				
	a	b	c	d	e
0	13,5	13,8	14,0	15,3	15,8
0,5	14,3	17,1	25,1	66,9	101,5
1	15,8	27,0	93,7	>120	>120
2	16,1	69,3	>120	-	-
2,5	16,5	>120	-	-	-
5	15,3	-	-	-	-
25	14,0	-	-	-	-

"Heparinoid BAYER"

Dosis in γ pro Ansatz	Gerinnungszeit in sec				
	a	b	c	d	e
0	13,6	14,0	14,1	15,2	15,6
0,5	20,1	20,4	19,9	22,1	20,1
1	32,6	31,1	31,7	32,5	34,7
2	-	-	>120	>120	>120

Bei Mengen über 1 γ "Heparinoid BAYER" pro Ansatz findet in den Systemen a und b keine normale Gerinnung, sondern eine flockige Ausfällung (von Fibrinogen?) statt, die wir nicht werteten.

"Heparinoid GEIGY"

Dosis in γ pro Ansatz	Gerinnungszeit in sec				
	a	b	c	d	e
0	13,7	14,1	14,3	15,3	15,7
1	14,2	15,2	17,8	18,1	20,7
2,5	13,9	16,9	19,2	21,3	28,1
5	13,7	17,4	20,9	27,5	37,6
25	12,5	16,5	16,8	37,7	>120
100	12,0	13,1	13,5	43,8	>120

ELEPARON^R

Dosis in γ pro Ansatz	Gerinnungszeit in sec				
	a	b	c	d	e
0	13,9	14,0	14,4	15,4	15,8
1	15,5	16,1	16,8	18,9	22,7
2,5	14,8	17,2	17,8	23,3	28,1
5	14,9	17,9	18,2	29,4	39,5
25	14,6	18,7	19,1	40,7	>120
100	14,5	16,2	18,5	-	-

THROMBOCID^R

Dosis in γ pro Ansatz	Gerinnungszeit in sec				
	a	b	c	d	e
0	13,5	14,0	14,4	15,2	15,7
1	14,3	14,5	15,0	18,2	19,9
2,5	14,0	14,7	15,3	20,8	22,6
5	13,8	14,7	15,6	21,6	24,5
25	11,7	12,8	14,3	24,3	26,1
100	11,5	11,6	11,4	14,1	33,4

Ergebnis:

α -Heparin und die Heparinoide "THROMBOCID^R, ELEPARON^R und "Heparinoid GEIGY" zeigen mit zunehmendem Plasmagehalt zunehmende Antithrombinwirkung. Dabei nimmt die Wirkung des α -Heparins schneller zu, als die der Heparinoide. THROMBOCID^R hat in allen Systemen deutlich die geringste Antithrombinwirkung. Der relative Rückgang der Antithrombinwirkung in plasmaarmen Systeme

men bei Hg, E und TH entspricht dem auf Seite 40 (beim 3. Punkt der Theorie R. PULVERS) geschilderten unspezifischen Effekt. Dieser Effekt muß aber nicht unbedingt auf einer Erschöpfung des "Heparinogen"-vorrates im Plasma beruhen, denn auch das α -Heparin zeigt ihn im System a (reine COHN-Fraktion I). Möglicherweise beruht er auf einer Erschöpfung des HCF-Gehaltes des Plasmas.

Auffallend ist das Verhalten des "Heparinoids BAYER":

Seine Antithrombinwirkung ist in den Systemen a und b stärker als die des α -Heparins und zeigt bei zunehmendem Plasmagehalt des Gerinnungssystems praktisch keine Zunahme.

R. PULVER beobachtet (176) ein ähnliches Verhalten (starke Antithrombinwirkung in COHN-Fraktion I) bei dem Heparinoid Dextransulfat. Er klammert dieses deshalb aus seiner Theorie über den Wirkungsmechanismus der Heparinoide aus.

Im folgenden sollen R. PULVERs Versuchsergebnisse über die Hemmung der Antithrombinwirkung des α -Heparins durch Heparinoide (176) reproduziert und dabei Unterschiede im Ausmaß dieser Hemmung, d.h. in der HCF-Affinität der oben erwähnten Heparinoide festgestellt werden.

R. PULVER untersuchte diese Hemmwirkung nur in einem plasmaarmen Gerinnungssystem (4 Teile Cohnfraktion I + 1 Teil Zitratplasma), wir außerdem noch in Zitratplasma als HCF-reichem Gerinnungssystem:

Ansatz:

0,16 ml Cohnfraktion I + 0,04 ml Zitratplasma

+0,1 ml NaCl (0,9 %ig)-, bzw. Testsubstanzlösung

+0,2 ml Thrombinlösung (TR, 10 N.I.H.E. pro 1 ml)

Ansatz	Konzentration in ‰ pro Ansatz					Gerinnungszeit
Nr.	HN	HB	HG	E	TH	in sec
1	-	-	-	-	-	14,3
2	0,5	-	-	-	-	29,2
3	-	2,5	-	-	-	114,6
4	0,5	2,5	-	-	-	>180
5	-	-	50	-	-	14,6
6	0,5	-	50	-	-	14,8
7	-	-	12,5	-	-	20,3
8	0,5	-	12,5	-	-	20,1
9	-	-	-	50	-	18,0
10	0,5	-	-	50	-	18,2
11	-	-	-	-	50	13,7
12	0,5	-	-	-	50	13,9
13	-	-	-	-	12,5	17,9
14	0,5	-	-	-	12,5	19,2

Ansatz:

0,2 ml Zitratplasma

+0,1 ml NaCl (0,9 %ig)-, bzw. Testsubstanzlösung

+0,2 ml Thrombinlösung (TR, 10 N.I.H.E. pro 1 ml)

Ansatz Nr.	Konzentration in γ pro Ansatz					Gerinnungszeit in sec
	HN	HB	HG	E	TH	
15	-	-	-	-	-	15,6
16	0,375	-	-	-	-	46,4
17	0,5	-	-	-	-	75,9
18	-	1,25	-	-	-	49,7
19	0,375	1,25	-	-	-	120
20	-	-	5	-	-	33,0
21	0,375	-	5	-	-	>120
22	-	-	-	5	-	39,2
23	0,375	-	-	5	-	>120
24	-	-	-	-	5	26,8
25	0,375	-	-	-	5	45,0
26	-	-	-	-	12,5	32,4
27	0,5	-	-	-	12,5	48,1
28	-	-	-	-	50	44,4
29	0,375	-	-	-	50	47,2

Ergebnis:

Im HCF-armen Gerinnungssystem kann durch "Heparinoid GEIGY", ELEPARON^R und THROMBOCID^R die α -Heparinwirkung gehemmt, in geeigneter Dosis sogar völlig unterdrückt werden (Ansatz Nr. 6 und Nr. 12); die stärkste Suppressivwirkung, d.h. die größte Affinität zum HCF hat das THROMBOCID^R (Ansatz Nr. 12).

Durch "Heparinoid BAYER" wird jedoch die Antithrombinwirkung des α -Heparin verstärkt (Ansatz Nr. 4).

Im Zitratplasma verstärken sowohl "Heparinoid BAYER" als auch "Heparinoid GEIGY" und ELEPARON^R die Antithrombinwirkung des α -Heparins. Ob es sich dabei um einen additiven oder einen potenziierten Synergismus handelt, wird im Rahmen der Erörterung des 4. Teiles der Theorie R. PULVERs über den Wirkungsmechanismus der Heparinoide untersucht werden.

Nur das THROMBOCID^R hemmt auch in Zitratplasma die Antithrombinwirkung des α -Heparins (Ansatz Nr. 25 und Nr. 27), bzw. ergibt in Mengen, die allein eine deutliche Antithrombinwirkung haben (Ansatz Nr. 28) nur eine ganz geringe Steigerung der Antithrombinwirkung des α -Heparins (Ansatz Nr. 29). Das THROMBOCID^R zeigt also von allen untersuchten Heparinoiden deutlich die größte HCF-Affinität.

Zum Nachweis, daß die Heparinoide außer dem HCF noch einen Faktor zu ihrer Antithrombinwirkung benötigen, stellte PULVER (176) ein HCF-Präparat her, das zwar die Wirkung des α -Heparins, nicht aber die Wirkung der Heparinoide katalysiert:

Aus einem mehrere Tage bei $+4^{\circ}\text{C}$ gestandenem Rinderzitratplasma wird nach der bereits beschriebenen Methode (S. 24) COHN-Fraktion I hergestellt. Vier Teile dieser Lösung mischt man mit einem Teil des Ausgangsplasmas und fällt 20 ml des Gemisches mit 10 ml Äthanol (96 %ig) bei 0°C . Man kühlt auf -10°C und zentrifugiert (Kühlzentrifuge). Die abgetrennte klare Lösung wird dann bei -10°C mit 0,4 ml 2 n Schwefelsäure versetzt, die Fällung bei dieser Temperatur aus-zentrifugiert, in 5 ml NaCl-Lösung (0,9 %ig) gelöst und mit einigen Tropfen Natriumbicarbonatlösung (1 %ig) neutralisiert.

Es gelang uns aber in mehreren Versuchen bisher nicht, nach dieser Methode eine Fraktion mit HCF-Aktivität herzustellen. Auf die Darstellung anderer HCF-Präparate wurde verzichtet, da sie nach R. PULVER (176) auch die Antithrombinwirkung der Heparinoide katalysieren, was R. PULVER auf in diesen Präparaten enthaltenes "Heparinogen" zurückführt.

Ad 3.) :

R. PULVER machte seine Beobachtung, daß die Antithrombinwirkung der Heparinoide begrenzt ist, in einem plasmaarmen Gerinnungssystem (1 Teil Zitratplasma + 2 Teile COHN-Fraktion I).

Wir untersuchten, ob sich dieser Effekt auch in Zitratplasma nachweisen

läßt. Zu diesem Zweck mußten wir eine andere Thrombinkonzentration wählen als in den bisherigen Versuchen (10 N.I.H.E. pro 1 ml = 2 N.I.H.E. pro Ansatz), denn bei dieser Konzentration liegen die Gerinnungszeiten für 0,5 - 1% α -Heparin pro Ansatz über 60 sec, ein Bereich, in dem die Genauigkeit der Messung abnimmt.

Ansatz:

0,2 ml Zitratplasma (Mischplasma)

+0,1 ml NaCl (0,9 %ig)-, bzw. Testsubstanzlösung

+0,2 ml Thrombinlösung (TR, 20 N.I.H.E. pro 1 ml)

pro Ansatz	Gerinnungszeit in sec			
	HN	HB	HG	E
0	10,8	10,6	10,7	10,6
0,5	13,2	12,9	-	-
0,7	17,1	-	-	-
1	22,4	15,7	11,4	11,2
1,5	33,5	18,6	-	-
2	60,3	25,3	12,7	13,4
5	>120	>120	15,0	14,9
10	-	-	15,2	15,3
100	-	-	17,5	16,7
250	-	-	16,4	15,2
500	-	-	16,1	14,9
2500	-	-	27,6	-

Ergebnis:

Die Wirkung der Heparinoide HG und E läßt sich auch in hoher Dosis nicht über einen Endwert steigern, der sich im verwendeten Versuchssystem auch durch eine Dosis von ungefähr 0,7% α -Heparin (Aktivität 0,1 I.E. pro 1%) erreichen läßt. Bei Mengen von 250% und 500% pro Ansatz ergibt sich sogar wieder eine Verkürzung der Thrombinzeit gegenüber diesem Maximalwert. Damit sind R. PULVERs Versuchsergebnisse in diesem Punkt auch für Zitratplasma bestätigt.

In extrem hoher Dosis (2500 pro Ansatz) findet sich bei "Heparinoid GEIGY" allerdings wieder eine Verlängerung der Thrombinzeit über jenen maximalen Endwert hinaus. Nach der Theorie R. PULVERs müßte man diesen Effekt als unspezifische Direktwirkung erklären.

"Heparinoid BAYER" zeigt auch in diesem Test eine Sonderstellung unter den verwendeten Heparinoiden: Es verhält sich, mit einem gewissen quantitativen Unterschied, wie α -Heparin.

Die in obiger Versuchsanordnung für einige Heparinoide ermittelte längste Thrombinzeit (d.h. maximale Antithrombinwirkung) entspricht nach

R. PULVER dem gesamten im Plasma vorhandenen (endogenen) Heparin, das durch das zugesetzte Heparinoid aus dem "Heparinogen" verdrängt werden soll. R. PULVER glaubt, auf diese Weise das endogene Plasmaheparin bestimmen zu können (177). Er fand in den von ihm untersuchten Plasmaproben eine Aktivität von 39-64 I.E. α -Heparin pro 100 ml. Die Aktivität des von uns verwendeten Zitratplasmas (da es sich um Mischplasma handelt, ein Durchschnittswert) betrüge 35 I.E. α -Heparin pro 100 ml, bei einer Umrechnung auf unverdüntes Plasma ungefähr 44 I.E. α -Heparin pro 100 ml.

Titer in dieser Höhe liegen tatsächlich innerhalb der in der Literatur (vgl. S. 12) angegebenen Werte, wenn auch in deren oberem Bereich. Allerdings ist auch nach R. PULVER der wahre Heparin Gehalt des Plasmas geringer (179): Zugesetztes α -Heparin werde im Testplasma zum Teil durch freies Trägerprotein inaktiviert, so daß man im α -Heparin-Ansatz mehr α -Heparin zugeben müsse, um dieselbe Antithrombinwirkung zu erreichen, wie sie im Heparinoid-Ansatz durch (aus "Heparinogen") freigesetztes Heparin erzeugt werde; freies Trägerprotein werde in diesem System durch überschüssiges Heparinoid abgesättigt [tatsächlich finden ZÖLLNER und Mitarb. (47), daß menschliches Plasma eine gewisse -mit 0,006 mg pro 100 ml allerdings sehr kleine- Menge α -Heparin zu inaktivieren vermag].

Ad 4.):

Zunächst wurde die Wirkung von α -Heparin-Heparinoidgemischen auf die Rekalzifizierungszeit (im folgenden abgekürzt als RKZ) von menschlichem Zitratblut und thrombozytenhaltigem Zitratplasma untersucht.

"Heparinoid GEIGY" und THROMBOCID^R

Ansatz:

0,2 ml Zitratblut (1 Teil Natriumzitratlösung 3,8 %ig + 4 Teile Venenblut)

+0,1 ml NaCl (0,9 %ig)-, bzw. Testsubstanzlösung

0,2 ml 1/40 m Kalziumchloridlösung

γ pro Ansatz	RKZ in sec		
	HN	HG	TH
0	184	171	176
0,5	283	-	-
0,75	316	-	-
1	402	208	-
1,5	486	243	-
2	760	285	340
4	-	315	495
5	-	347	-
7,5	-	521	-

α -Heparin - Heparinoidgemisch

γ pro Ansatz			RKZ in sec	
HN	HG	TH	tatsächliche	bei additiver Wirkung zu erwartende
0,25	1	-	390	285
0,375	2,5	-	609	347
0,75	3,75	-	695	521
0,375	-	1	418	340
0,75	-	2	538	495

Ansatz:

0,2 ml Zitratplasma (Zitratblut 5 min bei 1000 U/min zentrifugiert)
 +0,1 ml NaCl (0,9 %ig)-, bzw. Testsubstanzlösung
 +0,2 ml Kalziumchloridlösung

γ pro Ansatz	RKZ in sec	
	HN	HG
0	63	58
0,5	136	-
0,75	166	-
1	233	-
1,5	260	-
2	400	77
5	>720	104,5
12,5	-	160
25	-	225
50	-	440

 α -Heparin - Heparinoidgemisch

γ pro Ansatz			RKZ in sec	
HN	HG	tatsächliche	bei additiver Wirkung zu erwartende	
0,375	6,25	151	166	
0,5	12,5	212	225	

Ergebnis:

"Heparinoid GEIGY" und THROMBOCID^R zeigen in Kombination mit α -Heparin im Zitratblut eine deutliche überadditive Wirkung.
 Im Zitratplasma ist für die Mischung von "Heparinoid GEIGY" und α -Heparin nur eine additive Wirkung zu beobachten.

"Heparinoid BAYER"

Ansatz:

0,2 ml Zitratblut

+0,1 ml NaCl (0,9 %ig)-, bzw. Testsubstanzlösung

+0,2 ml 1/40 m Kalziumchloridlösung

γpro Ansatz	RKZ in sec	
	HN	HB
0	98	106
0,25	232	-
0,5	332	-
0,75	348	-
1	427	132
2	-	166
2,5	-	223
5	-	344

α-Heparin-Heparionidgemisch

pro Ansatz		RKZ in sec	
γHN	HB	tatsächliche	bei additiver Wirkung zu erwartende
0,125	1,25	225	232
0,375	2,5	340	348

Ansatz:

0,2 ml Zitratplasma

+0,1 ml NaCl (0,9 %ig)-, bzw. Testsubstanzlösung

+0,1 ml 1/40 molare Kalziumchloridlösung

γpro Ansatz	RKZ in sec	
	HN	HB
0	181	176
0,15	281	-
0,25	331	-
0,5	383	247
0,75	>540	324
1	-	382

α -Heparin-Heparinoidgemisch:

γ pro Ansatz		RKZ in sec	
HN	HB	tatsächliche	bei additiver Wirkung zu erwartende
0,075	0,25	365	281
0,25	0,5	673	383

Ergebnis:

"Heparinoid BAYER" zieht in Kombination mit α -Heparin in Zitratblut eine additive, in Zitratplasma eine deutlich überadditive Wirkung.

ELEPARON^R

Ansatz:

0,2 ml Zitratblut

+0,1 ml NaCl (0,9 %ig)- bzw. Testsubstanzlösung

+0,2 ml 1/40 m Kalziumchloridlösung

γ pro Ansatz	RKZ in sec	
	HN	E
0	204	187
0,1	281	-
0,25	319	-
0,5	375	-
1	-	284
2	-	390

 α -Heparin - Heparinoidgemisch

γ pro Ansatz		RKZ in sec	
HN	E	tatsächliche	bei additiver Wirkung zu erwartende
0,05	0,5	265	281-284
0,25	1	370	375-390

Ansatz:

0,2 ml Zitratplasma

+0,1 ml NaCl (0,9 %ig)-, bzw. Testsubstanzlösung

+0,2 ml 1/40 m Kalziumchloridlösung

γpro Ansatz	RKZ in sec	
	HN	E
0	251	215
0,2	300	-
0,25	429	-
0,5	-	318
1	-	361
2	-	575

α-Heparin - Heparinoidgemisch

γpro Ansatz		RKZ in sec	
HN	E	tatsächliche	bei additiver Wirkung zu wartende
0,1	0,25	335	300-318
0,125	0,5	404	361-429

Ergebnis:

ELEPARON^R zeigt in Kombination mit α-Heparin sowohl im Zitratblut, als auch im Zitratplasma eine additive Wirkung. Die Unterschiede zwischen den bei additiver Wirkung zu erwartenden und den tatsächlich gemessenen Rekalzifizierungszeiten liegen mit - 6 % (RKZ im Zitratblut), bzw. + 6 % (RKZ im Zitratplasma) noch innerhalb des Bereiches der Meßgenauigkeit der RKZ, können also nicht als signifikant für antagonistische bzw. überadditive Wirkung betrachtet werden.

Zusammenfassung der Ergebnisse über die Wirkung von α-Heparin-Heparinoidgemischen auf die Rekalzifizierungszeit von Zitratblut und Zitratplasma:

Für "Heparinoid GEIGY" und THROMBOCID^R konnten die Versuchsergebnisse R. PULVERs bestätigt werden; Diese Substanzen zeigten in Kombination mit α-Heparin eine deutlich überadditive Wirkung in der Rekalzifizierungszeit von Zitratblut. In Zitratplasma fanden wir für die Kombination "Heparinoid GEIGY" - α-Heparin jedoch nur eine additive Wirkung.

Gemische von α-Heparin und "Heparinoid BAYER" hatten in Zitratblut eine additive, in Zitratplasma eine deutlich überadditive Wirkung.

ELEPARON^R zeigte in Kombination mit α -Heparin sowohl in Zitratblut wie in Zitratplasma nur eine additive Wirkung.

Diese Versuchsergebnisse (Unterschiede zwischen Zitratblut und Zitratplasma bei ein und demselben Heparinoid) deuten darauf hin, daß die Blutzellen den α -Heparin-Heparinoidsynergismus modifizieren.

Außerdem müssen sich natürlich Unterschiede zwischen α -Heparin und Heparinoiden einerseits und den verschiedenen Heparinoiden untereinander andererseits, wie wir sie in den vorhergehenden Versuchen (zum 2. und 3. Teil der Theorie R. PULVERs) beobachteten und auch in der Literatur (s. S. 36) beschrieben fanden, in einem Globaltest wie der Rekalzifizierungszeit besonders stark auswirken.

Nun begrenzt ja R. PULVER seine Theorie über den Wirkungsmechanismus der Heparinoide -obwohl er (179) zu ihrer Stützung die überadditive Wirkung von α -Heparin-Heparinoidgemischen in der Rekalzifizierungszeit von Zitratblut heranzieht- strenggenommen auf die Antithrombinwirkung der Heparinoide (176). Man müßte also erwarten, daß sich die potenzierte Wirkung von α -Heparin-Heparinoidgemischen auch, bzw. gerade und besonders deutlich im Thrombinzeittest nachweisen läßt. Hierzu liegen von R. PULVERs Seite bisher keine Versuchsergebnisse vor.

Deshalb und um den α -Heparin-Heparinoidsynergismus anhand spezifischer Gerinnungstests zu differenzieren, wurde im folgenden die Wirkung von α -Heparin-Heparinoidgemischen auf die "Prothrombinzeit" (nach QUICK) und die Thrombinzeit untersucht.

"Prothrombinzeit"

(1-Phasenmethode nach QUICK)

Ansatz:

0,1 ml Zitratplasma

+0,1 ml NaCl (0,9 %ig)-, bzw. Testsubstanzlösung

+0,2 ml Thrombokinas-Kalziumgemisch

(Thrombokinaselösung + 1/40 m Kalziumchloridlösung zu gleichen Teilen).

pro Ansatz	Gerinnungszeit in sec				
	HN	HB	HG	E	TH
0	15,6	15,8	15,7	15,6	15,5
2	24,4	21,1	-	-	-
2,5	-	25,1	-	-	-
5	41,2	-	-	-	-
12,5	-	-	23,5	-	-
14	-	-	-	23,7	25,5

α -Heparin - Heparinoidgemisch

γ pro Ansatz					Gerinnungszeit in sec	
HN	HB	HG	E	TH	tatsächliche	bei additiver Wirkung zu erwartende
1	1,25	-	-	-	24,6	24,4 - 25,1
1	-	6,25	-	-	23,7	23,5 - 24,4
1	-	-	8	-	24,0	23,7 - 24,4
1	-	-	-	7	24,6	24,4 - 25,1

Ergebnis:

Alle untersuchten Heparinoide ergaben in Kombination mit α -Heparin in "Prothrombintest" nach QUICK eine additive Wirkung.

Thrombinzeit

Ansatz:

0,2 ml Zitratplasma

+0,1 ml NaCl (0,9 %ig)-, bzw. Testsubstanzlösung

+0,2 ml Thrombinlösung (TR, 10 N.I.H.E. pro 1 ml)

γ pro Ansatz	Gerinnungszeit in sec				
	HN	HB	HG	E	TH
0	13,2	13,4	13,0	13,1	13,1
0,25	28,5	-	-	-	-
1	-	30,2	-	-	-
4,5	-	-	-	27,5	-
5	-	-	28,6	-	-
12,5	-	-	-	-	28,2

 α -Heparin-Heparinoidgemisch:

γ pro Ansatz					Gerinnungszeit in sec	
HN	HB	HG	E	TH	tatsächliche	bei additiver Wirkung zu erwartende
0,125	0,5	-	-	-	34,1	28,5 - 30,2
0,125	-	2,5	-	-	28,4	28,5 - 28,6
0,125	-	-	2,25	-	28,5	27,5 - 28,5
0,125	-	-	-	6,25	23,8	28,2 - 28,5

Ergebnis:

Im Thrombinzeit (• Antithrombin) test zeigten "Heparinoid GEIGY" und ELEPARON^R in Kombination mit α -Heparin eine additive, "Heparinoid BAYER" eine überadditive und THROMBOCID^R eine deutlich unteradditive (antagonistische Wirkung).

III. Zusammenfassendes Ergebnis der experimentellen Untersuchungen des zweiten Hauptteiles

Eine endgültige Beurteilung der Theorie R. PULVERs über den Wirkungsmechanismus der Heparinoide [(176), (177), (178), (179), bzw. Seiten 39-41] ist wegen der bisher an technischen Schwierigkeiten gescheiterten Darstellung des von diesem Autor [(176), bzw. Seite 48] beschriebenen Heparincofaktorpräparates zur Zeit noch nicht möglich.

Zu einzelnen Punkten dieser Theorie haben unsere Untersuchungen jedoch Gegenargumente ergeben:

R. PULVER beschränkt (176) seine Theorie auf die Antithrombinwirkung der Heparinoide. Wenn nun, wie R. PULVER (179) annimmt, die überadditive Wirkung von α -Heparin-Heparinoid-Gemischen auf dem von ihm diskutierten "Release"-Mechanismus beruht, dann müßte sich eine Potenzierung auch und vor allem im Thrombinzeittest zeigen.

Für die untersuchten Heparinoide (darunter auch GEIGY-Präparat G 31150, mit dem R. PULVER u. a. arbeitete) ließ sich aber weder in der 1. Phase ("Prothrombinzeit" nach QUICK) noch in der 2. Phase (Thrombinzeit) der Blutgerinnung eine Potenzierung der Wirkung von α -Heparin nachweisen.

THROMBOCID^R wirkte in der 2. Phase der Blutgerinnung sogar antagonistisch zum α -Heparin. Lediglich das "Heparinoid BAYER" zeigte im Thrombinzeittest eine leichte Potenzierung der Wirkung von α -Heparin. Gerade dieses Heparinoid hat aber eine Eigenschaft (Antithrombinwirkung auch ohne Heparincofaktor), deretwegen R. PULVER (176) gewisse Heparinoide (z. B. das Dextransulfat) aus seiner Theorie ausklammert.

Die in unseren Versuchen reproduzierte überadditive Wirkung von α -Heparin-Heparinoidgemischen auf die Rekalzifizierungszeit von menschlichem Zitratblut muss, da sie sich in unseren Versuchen für Zitratplasma nicht nachweisen liess, auf einem Mechanismus beruhen, an dem zelluläre Bestandteile des Blutes beteiligt sind, kann also wohl nicht auf einen humoralen Mechanismus (wie R. PULVERs "Release"-Theorie) zurückgeführt werden.

Die beobachtete superadditive Wirkung von α -Heparin-Heparinoidgemischen auf die Rekalkifizierungszeit von Zitratblut läßt sich unseres Erachtens demnach als Stütze der ursprünglichen Hypothese R. PULVERS nicht verwenden.

Die in Heparincofaktorabhängigkeit und -Affinität von uns beobachteten Unterschiede zwischen α -Heparin und einigen Heparinoiden (darunter G 31150) einerseits und diesen Heparinoiden untereinander andererseits sind nur quantitativer Art.

Lediglich das "Heparinoid BAYER", das sich in unseren Versuchen bezüglich seiner Antithrombinwirkung als vom Heparincofaktor praktisch unabhängig erwies, scheint über einen anderen Wirkungsmechanismus zu verfügen.

Ein entsprechendes Verhalten wird in der Literatur auch vom Dextransulfat (176) und einem bestimmten Alginsäuresulfat (162) beschrieben. Derartige Heparinoide scheinen weiterer Untersuchungen wert.

LITERATURVERZEICHNIS

1. McLEAN, J.: The thromboplastin action of cephalin.
Amer. J. Physiol. 41:250 (1916).
2. JOHNSON, J. B.: The early history of heparin, its bleeding in the surgical patient.
Ann. New York Acad. Sc. 115:392 (1964).
3. SCHMIDT-MÜLHELM, A.: Beiträge zur Kenntnis des Peptons und seiner physiologischen Bedeutung.
Arch. Anat. Physiol. 4:44 (1880).
4. FANO, C.: Das Verhalten des Peptons und Tryptons gegen Blut und Lymphe.
Arch. f. Physiol. 5:277 (1881).
5. GROUJEAN, A.: Recherches sur l'action physiologique de la propeptone et de la peptone.
Arch. de Biol. 12:381 (1882).
6. CONTEJEAN, C.: Nouvelles recherches sur l'influence des injections intravasculaires de peptone sur la coagulabilité du sang chez le chien.
Arch. de Physiol. 27:245 (1895).
7. GLEY, E.; PACHON, V.: Influence des variations de la circulation lymphatique intra-hépatique sur l'action anticoagulante de la peptone.
Arch. de Physiol. 27:711 (1895).
8. GLEY, E.; PACHON, V.: Influence de l'extirpation du foie sur l'action anticoagulante de la peptone.
Compt. rend. Soc. Biol. 47:741 (1895).
9. SPITRO, K.; ELLINGER, A.: Der Antagonismus gerinnungsfördernder und gerinnungshemmender Stoffe im Blut und die sogenannte Pepton-Immunität.
Physiol. Chemie 23:121 (1897).
10. HEDON, E.; DELEZENNE, C.: Effects des injections intraveineuses de peptone apres extirpation du foie combinée a la fistule d'Eck.
Comp. rend. Soc. Biol. 48:633 (1896).

11. DOYON, M. ; MOREL, A. ; POLICARD, A. :
Extraction directe de l'antithrombine du foie.
Influence de la congelation.
Comp. rend. Soc. Biol. 70:341 (1911).
12. DOYON, M. ; POLICARD, A. :
Existence generale et repartition de l'antithrombine
dans l'organisme.
Compt. rend. Soc. Biol. 71:8 (1911).
13. DOYON, M. :
Rapports du foie avec la coagulation du sang.
J. Physiol. Pathol. (Gen.) 14:229 (1912).
14. HOWELL, W. H. ; HOLT, E. :
Two new factors in bloodcoagulation; heparin and
proantithrombin.
Amer. J. Physiol. 47:328 (1918).
15. DOYON, M. ; MOREL, A. ; POLICARD, A. :
Comparaison des effets sur la coagulation du sang
des liquides de maceration du foie, chez le chien, le
chat et le lapin.
Compt. rend. Soc. Biol. 70:433 (1911).
16. HOWELL, W. H. :
The purification of heparin and its presence in blood.
Amer. J. Physiol. 71:553 (1924).
17. HOWELL, W. H. :
The purification of heparin and its chemical and phy-
siological reactions.
Bull. Johns Hopkins Hosp. 42:199 (1928).
18. FISCHER, A. ; SCHMITZ, A. :
Über die chemische Natur des Heparins,
II. Die Reindarstellung des Heparins. Hoppe-Seylers
Z. physiol. Chem. 216:264 (1933) und
III. Einige Untersuchungen zur Konstitution des Heparins.
Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 216:274 (1933).
19. CHARLES, A. F. ; SCOTT, D. A. :
Studies on heparin.
J. biol. Chem. 102:425 (1933).
20. JORPES, J. E. :
The chemistry of heparin.
Biochem. J. 29:1817 (1935).

21. JORPES, J. E. ; BERGSTRÖM, S. :
Der Aminosucker des Heparins.
Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 244:253 (1936).
22. WOLFROM, M. L. ; RICE, F. A. H. :
The uronic acid component of heparin.
J. Amer. chem. Soc. 68, 532 (1946).
23. WOLFROM, M. L. ; WEISBLAT, D. J. ; KARABINOS, J. V. ;
McNEELEY, W. H. ; McLEAN, J. :
Chemical studies on crystalline barium acid heparinate.
J. Amer. chem. Soc. 65:2077 (1943).
24. JORPES, J. E. ; BERGSTRÖM, S. ; MUTT, V. :
The linkage of the amino group in heparin.
J. biol. Chem. 183:607 (1950).
25. JAKES, L. B. ; WATERS, E. T. ; CHARLES, A. F. :
A comparison of the heparin of various mammalian species.
J. biol. Chem. 144:229 (1942).
26. JORPES, J. E. ; GARDELL, S. :
On heparin monosulfuric acid.
J. biol. Chem. 176:267 (1948).
27. WILANDER, O. :
Studien über Heparin.
Skand. Arch. Physiol. 81 (Suppl. 15):89 (1938).
28. WOLFROM, M. L. ; RICE, F. A. H. :
Electrophoretic resolution of heparin and related polysaccharides.
J. Amer. Chem. Soc. 69:2918 (1947).
29. GASTPAR, H. ; BLASIUS, R. ; SEITZ, W. :
Vergleichende Untersuchungen über die unterschiedlichen Wirkungsstärke verschiedener Handelsheparine gleicher Konzentration.
Z. exp. Med. 126:554 (1956).
30. AWE, W. ; STÜDEMANN, K. D. :
Die papierchromatographische Charakterisierung von Heparin, Heparinoiden und heparinartigen Stoffen.
Arzneim. Forsch. 6:349 (1956).
31. REINERT, M. ; WINTERSTEIN, A. :
Contribution to the study of heparin.
Arch. int. Pharmacodyn. 62:47 (1939).

32. *Pharmakopoea internationalis* (1951; deutsche Übersetzung 1955),
Editio prima, Vol. I, Anlage 26, S. 370:
Bestimmung der Wirksamkeit von Heparin.
33. CHARGAFF, E.; BANCROFT, W.; STANLEY-BROWN, M.:
Studies on the chemistry of blood coagulation, II:
On the inhibition of blood clotting by substances of
high molecular weight.
J. biol. Chem. 115:153 (1936).
34. KARRER, P.; KOENIG, H.; USTERI, E.:
Zur Kenntnis blutgerinnungshemmender Polysaccharid-
polyschwefelsäure-ester und ähnlicher Verbindungen.
Helv. chim. Acta 26:1296 (1943).
35. MARBET, R.; WINTERSTEIN, A.:
 β -Heparin, ein neuer gerinnungshemmender Mucoitin-
schwefelsäureester.
Helv. chim. Acta 34:2311 (1951).
36. MARBET, R.; WINTERSTEIN, A.:
Zur Kenntnis der Mucopolysaccharide, besonders der
Heparine.
Experientia 8:41 (1952).
37. CIFONELLI, J. A.; LUDOWIEG, J.; DORFMAN, A.:
Chemistry of β -heparin (chondroitinsulfuric acid B).
J. biol. Chem. 233:541 (1958).
38. LISON, L.: La signification histochemique de la metachromasie.
Compt. rend. Soc. Biol. 118:821 (1935).
39. WINTERSTEIN, A.:
Biochemie und Pharmakologie der Antikoagulantien.
Thrombos. Diathes. haemorrh. 2:428 (1958).
40. JORPES, J. E.; HOLMGREN, H.; WILANDER, O.:
Über das Vorkommen von Heparin in den Gefäßwänden
und in den Augen.
Z. mikr.-anat. Forsch. 42:279 (1937).
41. SYLVEN, B.:
Über die Elektivität und Fehlerquellen der Schleim-
färbung mit Mucicarmin im Vergleich mit metachro-
matischer Färbung.
Virchows Arch. path. Anat. 303:280 (1938).
42. CASS, R.; HEAD, K. W.; RILEY, J. F.; STROUD, S. W.; WEST G. P.:
Heparin and histamine in mast cell tumors.
J. Physiol. (Lond.) 125:47 P (1954).

43. MONKHOUSE, F. C. ; JAKUES, L. B. :
An improved method for the extraction of heparin from blood.
J. Lab. clin. Med. 36:732 (1950).
44. ZÖLLNER, N. ; BURGER Ch. ; BRAUN, R. :
Eine Methode zur Isolierung von Heparin aus dem Plasma als Grundlage einer quantitativen Bestimmung.
Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 329:76 (1962).
45. GIBSON, R. B. ; CARR, T. L. ; GREEN, S. ; FOWLER, W. M. :
Photometric assay of plasma heparin.
Proc. Soc. exp. Biol. Med. 79:577 (1952).
46. KOLLATH, H. H. ; FISCHER, H. ; BREDDIN, K. :
Eine verbesserte Methode zur Heparinbestimmung im menschlichen Blutplasma.
Klin. Wschr. 41:1165 (1963).
47. JAKUES, L. B. ; MONKHOUSE, F. C. ; STEWART, M. :
A method for the determination of heparin.
J. Physiol. (Lond.) 109:41 (1949).
48. CHARLES, A. F. ; SCOTT, D. A. :
Studies on heparin, I: The preparation of heparin.
J. biol. Chem. 102:425 (1933).
Studies on heparin, II: Heparin in various tissues.
J. biol. Chem. 102:431 (1933).
49. ASTRUP, P. :
On the determination of heparin in blood and urine.
Acta pharmacol. toxicol. 3:165 (1947).
50. ENGELBERG, H. ; DUDLEY, A. ; FREEMAN, L. :
An improved method for the determination of plasma heparin.
J. Lab. clin. Med. 46:653 (1955).
51. EIBER, H. B. ; DANISHEFSKY, J. :
Heparin in blood.
Proc. Soc. exp. Biol. Med. 94:801 (1957).
52. NILSSON, J. M. ; WENCKERT, A. :
Demonstration of a heparin-like anticoagulant in normal blood.
Acta med. scand. 150 (Suppl. 297) (1954).
53. QUICK, A. J. :
Hemorrhagic diseases.
Lea & Febiger, Philadelphia (1959).

54. QUICK, A. J.:
On the coagulation defect in peptone shock (a consideration of antithrombins).
Amer. J. Physiol. 116:535 (1936).
55. JAKES, L. B.; WATERS, E. T.:
The identity and the origin of the anticoagulant of anaphylactic shock in the dog.
J. Physiol. (Lond.) 99:454 (1941).
56. MONKHOUSE, F. C.:
An investigation of the coagulation defect brought about in rabbits and dogs by the intravenous injection of papain.
Canad. J. Biochem. Physiol. 33:112 (1955).
57. SMITH, T. R.:
A coagulation-defect produced by nitrogen mustard.
Science 107:474 (1948).
58. SCHNEIDER, C. L.:
Release of anticoagulant during shock of experimental meconium embolism.
Amer. J. Obst. Gynec. 65:245 (1953).
59. ALLEN, J. G.:
Hyperheparinemia: Cause of the hemorrhagic syndrome associated with total body exposure to ionizing radiation.
Science 105:388 (1947).
60. HENSEN, A.; LOELIGER, E. A.:
Antithrombin III.
Thrombos. Diathes. haemorrh. 9 (Suppl. 1) (1963).
61. HENI, F.; KRAUS, J.:
Angeborene, familiäre Gerinnungsstörung durch heparinartigen Hemmkörper.
Klin. Wschr. 34:747 (1956).
62. MARX, R.: Die Durchführung der Antikoagulantientherapie.
Wien. med. Wschr. 115:29 (1965).
63. SOULIER, J. -P.:
Action of heparin in the blood coagulation system. Transactions of the conference, held under the auspices of the Int. Committee on Blood Clotting Factors: Heparin and thromboplastin. S. 37-S. 44.
K. F. Schattauer-Verlag, Stuttgart (1962).

64. OWREN, P. A.:

The coagulation of blood: Investigations on a new clotting factor.

Acta. med. scand. 128 (Suppl. 194) (1947).

65. WAUGH, T. R.; RUDDICK, D. W.:

A test for increased coagulability of the blood.

Canad. med. Ass. J. 50:547 (1944).

66. MARBET, R.; WINTERSTEIN, A.:

Über die Wirkung von Antikoagulantien des Heparintyps auf die 1. Phase der Blutgerinnung.

Helv. physiol. Acta 10:528 (1952).

67. HALEY, Th. J.; STOLARSKY, F.:

Effect of histamine and antihistaminics on coagulation of normal and heparinized rabbit plasma.

Proc. Soc. exp. Biol. Med. 76:299 (1951).

68. ZÜRN, H.: Einwirkung verschiedener Antihistaminica auf die Blutgerinnung.

Ärztl. Forsch. 10:370 (1956).

69. JAUQUES, L. B.:

The reaction of heparin with proteins and complex bases.

Biochem. J. 37:189 (1943).

70. HOWELL, W. H.:

Theories of blood coagulation.

Physiol. Rev. 15:435 (1935).

71. HORN, Z.; GERENDAS, M.; BORSODI, L.:

Die Wirkung des Toluidinblaus und der Thrombokinas auf den Vorgang der Thrombininaktivierung.

Experientia 4:402 (1948).

72. QUICK, A. J.:

On the action of heparin and its relation to thromboplastin.

Amer. J. Physiol. 115:317 (1936).

73. v. KAULLA, K. N.; McDONALD, S. T.; TAYLOR, G. H.:

The effect of heparin on fibrinolysis.

J. Lab. clin. Med. 48:952 (1956).

74. OLESEN, E. S.:

Effect of acid polysaccharides in the fibrinolytic system in guinea-pig serum.

Acta pharmacol. toxicol. 15:307 (1959).

75. OLESEN, E. S.:
Fibrinolytic activity produced in guinea-pig serum by some human body fluids and by hyaluronic acid.
Scand. J. clin. Lab. Invest 13:37 (1961).
76. OLESEN, E. S.:
A fibrinolytic system in human plasma activated by peptone or acid polysaccharides.
Scand. J. clin. Lab. Invest. 13:410 (1961).
77. MARX, R.: Wirkungsweise der Fibrinolytika und Antifibrinolytika.
Thrombos. Diathes. haemorrh. Suppl. 3 ad Vol. 7:28 (1963).
78. SZCZEKLIK, E.; JANIAKOWA, A.:
Die Bedeutung der Blutgerinnungsfaktoren in der Pathogenese der Koronarthrombose.
Z. ges. inn. Med. 12:639 (1957).
79. MARX, R.; SCHMIDT, H.:
Über den Einfluß von Antikoagulantien auf die Fibrinolyse im menschlichen Serum.
Ärztl. Forsch. 5:192 (1951).
80. KAULLA, K. N.; McDONALD, T. S.:
The effect of heparin on components of the human fibrinolytic system.
Blood 13:811 (1958).
81. HALSE, Th.:
Heparin, Heparinoide, Dicumarol.
Hirzel-Verlag, Stuttgart (1950).
82. HALSE, Th.:
Aktivierung der Fibrinolyse und Thrombolyse durch Polysaccharidschwefelsäureester (Heparin, Heparinoide).
Arzneim. Forsch. 12:574 (1962).
83. HAHN, P. F.:
Abolishment of alimentary lipemia following injection of heparin.
Science 98:19 (1943).
84. SHORE, B.; NICHOLS, A. V.; FREEMAN, N. K.:
Evidence for lipolytic action by human plasma obtained after intravenous administration of heparin.
Proc. Soc. exp. Biol. Med. 83:216 (1953).

85. GRAHAM, D. M.; LYON, Th. P.; GOFMAN, J. W.; HARDIN, B. J.;
YANKLEY, A.; SIMONTON, J.; WHITE, S.:
Blood lipoids and human atherosclerosis, II:
The influence of heparin upon lipoprotein metabolism.
Circulation 4:666 (1951).
86. ZÖLLNER, N.; ROTHMUND, E.; SEITZ, W.:
Ein antilipämisches, nichtgerinnungshemmendes Ab-
bauprodukt des Heparins.
Klin. Wschr. 32:1096 (1954).
87. BOETSCH, M.:
Vergleichende Untersuchungen über die prophylaktische
Wirkung von Heparin, Heparinoiden und Neodym auf
die experimentelle Arterio-Atherosklerose des Ka-
ninchens.
Dissertation, München (1956).
88. ENGELBERG, H.:
A controlled study of the effect of intermittent heparin
therapy on the course of human coronary atherosclerosis.
Circulation, 13:489 (1956).
89. CONSTANTINIDES, P.; CAIRNS, A.; WERNER, A.:
Antilipemic activity of sulfated polysaccharides.
Arch. int. Pharmacodyn. 99:334 (1954).
90. FISCHER, A.; HERRMANN, H.:
Über die Hemmung der Fumarasewirkung durch Heparin.
Enzymologia 3:180 (1937).
91. McCLEAN, D. J.:
The in-vivo decapsulation of streptococci by hyaluroni-
dase.
J. Path. Bact. 54:284 (1942).
92. DUMAZERT, C.:
Sur l'antagonisme de l'heparine et du lysozyme dans
la coagulation sanguine.
Compt. rend. Soc. Biol. 147:836 (1953).
93. HEDENIUS, P.; SNELLMAN, B.:
Något om heparinets hämmande egenskaper i andra
avseenden än beträffande blodkoagulationen.
Nord. med. Tskr. 13:914 (1937).
94. ZÖLLNER, N.:
Hemmung der Ribonuclease durch Heparin.
Naturwissenschaften 39:523 (1952).

95. BURUIANA, L. M.:
L'action de l'héparine sur les phosphatases.
Naturwissenschaften 44:306 (1957).
96. MYRBÄCK, K.; PERSSON, B. H.:
Action of heparin on barley β -amylase.
Chem. Abstr. 47:153 (1953).
97. LEVEY, S.; SHEINFELD, D. S.:
The inhibition of the proteolytic action of pepsin by
sulfate-containing polysaccharides.
Gastroenterology 27:625 (1954).
98. KLINGENBERG, H. G.:
Die Beeinflussung der Kathepsinverdauung durch Heparin.
Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 228:89 (1951).
99. HORWITT, M. K.:
Trypsin and chymotrypsin versus heparin.
Science 101:376 (1945).
100. DYCKERHOFF, H.; MARX, R.; ZIEGLER, W.:
Anaphylaxie und Blutgerinnung.
Z. exp. Med. 108:772 (1940).
101. JÜRGENS, E. G.:
Der Effekt von Polysacchariden und Nebennierenrinden-
hormonen beim anaphylaktischen Schock der Ratte, aus-
gelöst durch Anti-Rattenbindegewebe-Serum.
Arzneim. Forsch. 6:369 (1956).
102. EYLAU, O.:
Intraarticuläre Heparin-Behandlung der genuinen
Arthrosis deformans der Kniegelenke.
Med. Klin. 54, I: 145 (1959).
103. GLAZEBROOK, A. J.; WRIGLEY, F.:
Clinical trials of succinates and of heparin in rheumatic
fever.
Brit. med. J. 1949:789 (1949).
104. HOWE, G. W.; ARMBRUST, Ch. A.; MOIZE, D. L.; WAGNER, E. L.:
Preliminary report of the antirheumatic action of he-
parin and Paritol in gout and rheumatoid arthritis.
Am. J. med. Sci. 223:258 (1952).
105. GODLOWSKY, Z.:
Die Heparin- (Antiprothrombin-) Verwendung zwecks
Funktionsprüfung des menschlichen retikulo-endo-
thelialen Systems.
Wien. med. Wschr. 83:1034 (1933).

106. PELLMONT, B. ; BÄCHTOLD, H. : l. c. JÜRGENS, R. :
Pharmakologische Beeinflussung der Blutgerinnung.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmac.
222:107 (1954).
107. HARDEGG, W. ; MAASS, W. ; MAYER, G. ; HUHNSTOCK, K. :
Über die Wirkung von Heparin auf den experimentellen
Hochdruck bei Ratten.
Klin. Wschr. 33:811 (1955).
108. HARDEGG, W. ; HUHNSTOCK, K. ; MAASS, W. ; ABEL, H. :
Zum Mechanismus der blutdrucksenkenden Wirkung
von Heparin.
Klin. Wschr. 34:763 (1956).
109. KELLER, R. :
Neue Erkenntnisse in der Therapie der Hypertonie.
Praxis 42:12 (1953).
110. KELLER, R. :
Die Therapie der Hypertonie mit Heparin, II. Mitteil-
ung. Praxis 43:113 (1954).
110. KELLER, R. :
Der heutige Stand der Heparinbehandlung der Hyper-
tonie.
Medizinische 1955:1251 (1955).
112. SCHLATMANN, R. J. A. F. M. ; PRENEN, H. ; JANSEN A. P. ;
MAJOOR, C. L. H. :
The natriuretic action of heparin and some related
substances.
Lancet 1960, I: 314 (1960).
113. CEJKA, V. ; de VRIES, L. A. ; SMORENBERG-SCHOORL, M. E. ;
van DAATSELAAR, J. J. ; BORST, J. G. G. ; MAJOOR, C. L. H. :
Effect of heparinoid and spiro lactone on the renal
excretion of sodium and aldosterone.
Lancet 1960, I: 317 (1960).
114. SCHLATMANN, R. J. A. F. M. ; JANSEN, A. P. ; PRENEN, H. ;
van der KORST, J. K. ; MAJOOR, C. L. H. :
The natriuretic and aldosterone suppressive action of
heparin and some related polysulfatet polysaccharides.
J. clin. Endocr. Met. 24:35 (1964).
115. CONN, J. W. ; ROVNER, D. R. ; COHEN, E. L. ; ANDERSON jr. J. E. :
Inhibition by heparinoid of aldosterone biosynthesis in
man.
J. clin. Endocr. Met 26:527 (1966).

116. ABRAHAMS, D. G. ; HOWARTH, S. :
Discussion of the use of anticoagulants: A peripheral
action of heparin.
Brit. Heart J. 12:429 (1950).
117. STORTI, E. ; VACCARI, F. ; SCARDOVI, G. :
Die vasomotorische Wirkung von Heparin bei Normalen
und bei an Raynaudscher Krankheit leidenden Patienten.
Experientia 10:225 (1954).
118. GILBERT, N. C. ; NALEFSKI, L. A. :
The effect of heparin in increasing coronary flow volume.
J. Lab. clin. Med. 34:797 (1949).
119. FERRERO, C. :
Traitement de l'angine de poitrine par l'héparine.
Cardiologia 23:102 (1953).
120. EIBER, H. B. ; DANISHEFSKY, J. :
Synthesis and metabolism of radioactive heparin.
Arch. int. Med. 102:189 (1958).
121. EIBER, H. B. ; DANISHEFSKY, J. :
Physiological disposition of heparin.
Proc. Soc. exp. Biol. Med. 98:672 (1958).
122. MARBET, R. ; WINTERSTEIN, A. :
Probleme der Blutgerinnung, 3. Mitteilung: Über die
Ausscheidung des Heparins im Urin.
Helv. Physiol. Acta 9:24 (1951).
123. BEST, C. H. ; JAKES, L. B. :
Heparin in blood clotting and thrombosis.
Ann. New York Acad. Sci. 49:501 (1948).
124. JAKES, L. B. :
Heparinase.
J. biol. Chem. 133:445 (1940).
125. HERZ, A. : Über Speicherung und Ausscheidung eines mit 35 S
markierten Mucopolysaccharides.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmacol.
236:343 (1959).
126. MARBET, R. ; WINTERSTEIN, A. :
Probleme der Blutgerinnung, 2. Mitteilung:
Nephelometrische Methode zur Bestimmung des Heparins
im Urin.
Helv. Physiol. Acta 9:17 (1951).

127. QUICK, A. J. :
Is heparin an antiprothrombin?
Proc. Soc. exp. Biol. Med. 35:391 (1936).
128. FERGUSON, J. H. :
Heparin and natural antiprothrombin in relation to
activation and "assay" of prothrombin.
Am. J. Physiol. 134:47 (1941).
129. JAKES, L. B. ; MUSTARD, R. A. :
Some factors influencing the anticoagulant action of
heparin.
Biochem. J. 34:153 (1940).
130. LOEB, J. : Le cofacteur plasmatique de l'héparine et les rapports
avec l'antithrombine.
Arch. Sci. Physiol. 10:129 (1956).
131. BURSTEIN, M. ; LOEB, J. :
Antithrombine naturelle et cofacteur plasmatique de
l'héparine.
Compt. rend. Acad. Sci. 239:904 (1954).
132. ASTRUP, P. ; DARLING, S. :
Antithrombin und Heparin.
Naturwissenschaften 29:300 (1941).
133. ASTRUP, P. ; DARLING, S. :
Measurement and properties of antithrombin.
Acta physiol. Scand. 4:293 (1942).
134. VOLKERT, M. :
Studies on the antithrombin content of the blood and its
relations to heparin.
Acta physiol. Scand. 5, Suppl. 15 (1942).
135. LYTTLETON, J. W. :
The antithrombin activity of human plasma.
Biochem. J. 58:8 (1954).
136. LEWIS, J. H. ; WALTERS, P. ; DIDISHEIM, P. ; MERCHANT, W. R. :
Application of continuous flow electroforesis on the
study of the blood coagulation proteins and the fibrinolytic
enzyme system.
J. clin. Invest. 37:1323 (1958).
137. KNEDEL, M. ; SPERL, F. :
Über ein präparatives Elektrophorese-Verfahren mit
Kartonpapier als Trägermaterial.
Blut 5:65 (1959).

138. MARX, R. ; BAYERLE, H. :
Über die Bestimmung der Prothrombinzeit in kleinen
Mengen Kapillarblut.
Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 283:243 (1948).
139. KEKWICK, A. ; MACKAY, M. F. ; NANCE, M. H. ; RECORD, B. R. :
The purification of human fibrinogen.
Biochem. J. 50:671 (1955).
140. MARX, R. :
Verfahren zur Erhöhung der Haltbarkeit von Thrombin
in wässriger Lösung.
BR-Deutschland-Patent Nr. 87957, Klasse 3h, Gruppe 204.
141. MARX, R. ; VATH, A. :
Über experimentelle Untersuchungen mit einer synthe-
tischen, heparinartigen Substanz (Polysaccharidschwe-
felsäureester-Thrombocid) in Hinsicht auf deren Ver-
wendbarkeit als Antikoagulans und Antithrombotikum.
Ärztl. Forsch. 3:131 (1949).
142. PULVER, R. :
Heparinoide: Chemie und tierexperimentelle Prüfung.
Chemotherapie Vol. 3, No. 4 (1961).
143. GEBAUER-FÜLNEGG, E. ; STEVENS, W. H. ; DINGLER, O. :
Schwefelsäure-ester aus Cellulose.
Ber. Dtsch. Chem. Ges. 61:2000 (1928).
144. TRAUBE, W. ; BLASER, B. ; GRUNERT, C. :
Über Cellulose-Schwefelsäure-ester.
Ber. Dtsch. Chem. Ges. 61:754 (1928).
145. DEMOLE, V. ; REINERT, M. :
Polyanetholsulfosaures Natrium, ein neues syntheti-
sches Mittel zur Hemmung der Blutgerinnung.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak.
158:211 (1930).
146. BERGSTRÖM, S. :
Über Polysaccharidesterschwefelsäuren mit Heparin-
wirkung.
Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 238:163 (1936).
147. MARX, R. :
Ein neues Antikoagulans und Antithrombotikum vom Typ
der Heparin-Körper.
Arzneim. Forsch. 6:667 (1956).

148. SCHÖN, H. ; SAUER, M. :
Die lipolytische Aktivität einiger antiatherosklerotischer Medikamente.
Arzneim. Forsch. 13:718 (1963).
149. WOLFF, R. :
Etude de l'activite clarefiante d' un polyester du pentosane administre au lapin par voie intraveineuse.
Therapie 17:1133 (1962).
150. SCHWARTZ, J. ; BLOCH, R. ; WARTER, J. :
Essai d' un nouvel heparinoide, le 8061 CB.
Ann. Biol. Clin. 20:1031 (1963).
151. MEYER, K. :
The biological significance of hyaluronic acid and hyaluronidase.
Physiol. Rev. 27:335 (1947).
152. v. CANEGHEM, P. ; MARX, R. ; SPIER, H. W. :
Beziehungen zwischen Hyaluronidasehemmung und der antikoagulierenden Wirksamkeit von Heparin und Heparinoiden.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. 227:149 (1955).
153. SCHWENKERT, E. :
Ein Versuch zur Klärung der Bienengifthämolyse.
Dissertation, München (1951).
154. EYLAU, O. :
Zur Pathogenese und kausalen Therapie der Kniegelenksarthrosen.
Med. Klin. 55:2367 (1960).
155. DIETRICH, K. F. ; ANDERS, C. ; GASTPAR, H. :
Zur Behandlung der Paratenonitis crepitans mit Polysaccharidschwefelsäureestern.
Zbl. Chir. 83:1707 (1958).
156. VODOPIVEC, M. ; BAUMGARTNER, R. :
Zur Behandlung der Hypertonie mit Thrombocid.
Praxis 43:938 (1954).
157. KOCZOREK, K. :
Persönliche Mitteilung.

158. WALTON, W.:
The biological behaviour of a new synthetic anticoagulant (dextrane-sulphate) possessing heparin like properties.
Brit. J. Pharmacol. 7:370.
159. WALTON, W.:
Experiments with dextran-sulphate as an anticoagulant.
Proc. Roy. Soc. Med. 44:563 (1951).
160. WOLFROM, M.; CHEN HAN, T. M.:
The sulfonation of chitosan.
J. Am. Chem. Soc. 81:1764 (1959).
161. MEYER, K. H.; PIROUE, R. P.; ODIER, M. E.:
Les derives sulfates de l'acide chondroïtine - sulfurique et leur action anticoagulante.
Sur les polysaccharides amines IV.
Helv. Chim. Acta 35:574 (1952).
162. MOLHO, D.; COTTE, J.:
Coagulation sanguine et anticoagulante II: Esters sulfurique des alginates;
Preparation et action in vitro sur les facteurs de la coagulation.
Bull. soc. chim. biol. 33:312 (1951).
163. ASTRUP, T.:
Polysaccharide sulfuric acids as anticoagulants.
Acta physiol. Scand. 8:215 (1944).
164. BURSTEIN, M.; GUINAND, A.:
Activité antithrombinique et allongement du temps du thrombine.
Etude comparée de l'héparine et de quelques héparinoïdes de synthèse.
Arch. int. Pharmacodyn. 102:96 (1955).
165. MARX, R.:
Bericht über GEIGY-Präparat G 31150, unveröffentlicht.
166. MARX, R.:
Über das neue heparinähnliche Antithrombotikum Thrombocid.
Therap. Gegenwart 2:37 (1950).
167. BELLER, F.:
Thrombose und Embolie.
Ref. 1. int. Tagung Basel, S. 809 (Verlag B. Schwabe, Basel, 1954).

168. HIRSCHBOECK, J. S. ; MADISON, F. W. ; PISCIOTTA, A. V. :
Alopecia and other toxic effects of heparin and synthetic
heparinoids.
Am. J. med. Sci. 227:279 (1954).
169. THOMAS, L. :
Studies on the generalised Shwartzmanreaction VII:
The role of fibrinogen in the deposition of fibrinoid
after combined injections of endotoxin and synthetic
acidic polymer.
J. exp. Med. 102:263 (1955).
170. WALTON, W. :
Anaphylactoid response in guinea-pigs to the parenteral
administration of sulphate esters of high molecular weight.
Nature 173:31 (1954).
171. HILDEBRAND, G. :
Zur Analyse der Anaphylaktoiden Reaktion.
1. Mitteilung: Senkung des Blutdruckes, Versagen des
Herzens.
Arzneim. Forsch. 7:91 (1957).
172. SASAKI, S. :
A propos de la toxicité du sulfate de dextrane, anti-
coagulant synthétique.
Compt. rend. Soc. Biol. 151:1799 (1958).
173. ASTRUP, T. :
The toxicity of synthetic heparin substitutes.
Scand. J. clin. Lab. Invest. 5:137 (1953).
174. GOOSSENS, N. :
Zum Problem der perkutanen Thrombo-Embolie-
Prophylaxe.
Med. Mschr. 7:94 (1953).
175. PULVER, R. ; MONTIGEL, C. ; HERRMANN, B. :
Über einen neuen Polyschwefelsäureester mit Heparin-
ähnlicher Wirkung.
Arzneim. Forsch. 13:194 (1963).
176. PULVER, R. :
Über den Wirkungsmechanismus der Heparinoide.
Arzneim. Forsch. 12:582 (1962).
177. PULVER, R. :
Das Heparinogen (2. Mitteilung über den Wirkungsmecha-
nismus der Heparinoide).
Arzneim. Forsch. 13:581 (1963).

178. PULVER, R.:

Die Antithrombinwirkung von Heparinoiden in vivo
(3. Mitteilung über den Wirkungsmechanismus der
Heparinoide).

Arzneim. Forsch. 13:1010 (1963).

179. PULVER, R.:

Die Potenzierung der Heparinwirkung durch Heparinoide
(4. Mitteilung über den Wirkungsmechanismus der
Heparinoide).

Arzneim. Forsch. 15:1320 (1965).

180. HAUSCHILD, F.:

Pharmakologie und Grundlagen der Toxikologie,
3. Auflage (VEB Georg Thieme, Leipzig, 1961),
Seiten 584 und 590.

181. FISCHER, A.:

Die Bindung von Heparin an Eiweiß.

Biochem. Z. 278:133 (1935).

182. JAKES, L. B.; JAKES, C. M.:

The disappearance of heparin activity with liver
globulins and determination of heparinase.

Thrombos. Diathes. haemorrh. 10:71 (1963).

Monographien:

ENGELBERG, H.:

Heparin, metabolism, physiology and clinical applica-
tion.

Thomas, Springfield, Ill. (1963).

GASTPAR, H.: Physiologische Bedeutung und pharmakologische Wir-
kungen des Heparins.

Thrombos. Diathes. haemorrh. Suppl. 16 (1965).

Mein Dank gilt

Herrn Prof. Dr. med. Herbert SCHWIEGK, Direktor der I. Medizinischen Klinik der Universität München für die Übernahme des Co-referates,

Herrn Prof. Dr. med. Rudolf MARX, Leiter des Hämatologisch-Hämostaseologischen Laboratoriums der I. Medizinischen Klinik der Universität München für die Überlassung des Themas, des Laborplatzes und die Förderung, die er dieser Arbeit immer wieder durch wertvolle Anregungen zuteil werden ließ, seinen Mitarbeiterinnen für Rat und Hilfe in technischen Schwierigkeiten

und Herrn Dozenten Dr. med. Maximilian KNEDEL, Chefarzt des Klinisch-Chemischen Institutes des Städtischen Krankenhauses München-Harlaching und seinen Mitarbeiterinnen im Eiweiß-Laboratorium der I. Medizinischen Klinik der Universität München für die Durchführung der Kartonpapier-Elektrophoresen.

